



4-(1-メチルプロピル)フェノール  
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 .....	7
Tables 1～4	

## 【要 約】

4-(1-メチルプロピル) フェノ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、用量設定試験では直接法および代謝活性化法のいずれも、50～5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の用量で、本試験は直接法では 6.25～200  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、代謝活性化法では 12.5～400  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の用量で試験を実施した。

その結果、2回の本試験とも、用いた5種類の検定菌について、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、4-(1-メチルプロピル) フェノールは、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、4-(1-メチルプロピル)フェノールについて、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<sup>(1)</sup>、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<sup>(2)</sup>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、 $-80^{\circ}\text{C}$ 以下で凍結保存した。

試験に際して、ニュートリエントプロスNa 2 (OXOID, B-1674/1) を入れたL字型試験管に種菌を接種し、 $37^{\circ}\text{C}$ 、約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〕

4-(1-メチルプロピル)フェノール (CAS No. 99-71-8、以下M P Pと略) は、分子量 150.21 のフェノール臭を有する淡黄色固体である。純度 66%のもの (ロット番号：  
 ) を から供与された。被験物

質は、使用時まで室温にて遮光して保管した。

M P Pは、ジメチルスルホキシド (以下 DMSO と略、ロット番号：TWP 5445 および TWP5887、和光純薬工業(株)) に  $50\text{ mg/ml}$  あるいは  $40\text{ mg/ml}$  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M P Pの DMSO 溶液中での安定性試験を高濃度 ( $15\text{ mg/ml}$ ) および低濃度 ( $60\text{ }\mu\text{g/ml}$ ) 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 3 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、いずれも 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、 $4\text{ mg/ml}$  溶液の含量は既定濃度に対し、108~110%、 $62.5\text{ }\mu\text{g/ml}$  溶液は、109~110%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、MPP は DMSO 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、 $-20^{\circ}\text{C}$  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) バクトアガー (Difco)	0.6%	(B) L-ヒスチジン	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) 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
リン酸水素二カルシウム	10 g	バクトアガー (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)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。また、ラットの解剖および S9 の調製は5日目に行った。

[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。

小試験管中にトッパアガー 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 DMSO、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°C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。用量設定試験は追加試験を含めて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、2 に示した。MPP について、50～5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の範囲で公比を約 3 とし、試験を実施したところ、WP2 の代謝活性化法を除いて、すべての検定菌の直接法および代謝活性化法において 500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上の用量で抗菌性が認められ、TA1537 の代謝活性化法では 150  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の用量でも認められた。そのため、200 および 400  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の用量で追加試験を行ったところ、直接法ではすべての検定菌において 200  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  でも抗菌性が認められ、代謝活性化法では TA100 と TA1537 においては 200  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  で、それ以外の検定菌では 400  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  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を、すべての検定菌で、直接法では 200  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、代謝活性化法では 400  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  とし、公比 2 で、6 用量を設定することとした。

### 〔本試験〕

結果を Table 3、4 に示した。MPP について、直接法では 6.25～200  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、代謝活性化法では 12.5～400  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の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、陰性対照の 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。また、すべての検定菌において抗菌性が直接法では 200  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、代謝活性化法では 400  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の用量で認められた。

MPP 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、MPP 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 4-(1-Methylpropyl) phenol

With (+) or without (-) S9 Mix	Test substance dose ( $\mu\text{g}$ / 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	120	124	123	9	7	10	19	11	14	17	12	23	16	9	8	( 122 $\pm$ 2.1 )	( 9 $\pm$ 1.5 )	( 15 $\pm$ 4.0 )	( 17 $\pm$ 5.5 )	( 11 $\pm$ 4.4 )
	50	103			9			8			11			0							
	150	103			9			6			14			9							
	500	0 *			1 *			0 *			0 *			0 *							
	1500	0 *			0 *			0 *			0 *			0 *							
	5000	0 *			0 *			0 *			0 *			0 *							
S9 Mix (+)	0	122	119	110	11	12	13	14	12	13	29	28	31	17	10	9	( 117 $\pm$ 6.2 )	( 12 $\pm$ 1.0 )	( 13 $\pm$ 1.0 )	( 29 $\pm$ 1.5 )	( 12 $\pm$ 4.4 )
	50	146			14			5			14			8							
	150	123			12			4			15			0 *							
	500	46 *			2 *			3			1 *			0 *							
	1500	0 *			0 *			0 *			0 *			0 *							
	5000	0 *			0 *			0 *			0 *			0 *							
Positive control S9 Mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA							
	Dose ( $\mu\text{g}$ / plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80							
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA							
	Dose ( $\mu\text{g}$ / 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 $\pm$ 28.6 )	( 232 $\pm$ 43.1 )	( 423 $\pm$ 2.1 )	( 217 $\pm$ 20.4 )	( 173 $\pm$ 21.5 )

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.

Table 2. Results of preliminary cytotoxicity test in bacterial reverse mutation assay with 4-(1-Methylpropyl) phenol

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	122	112	110	10	14	12	17	16	29	16	15	17	11	9	5	
		( 115 $\pm$ 6.4 )			( 12 $\pm$ 2.0 )			( 21 $\pm$ 7.2 )			( 16 $\pm$ 1.0 )			( 8 $\pm$ 3.1 )			
	200	45 *			3 *			5 *			0 *			5 *			
	400	0 *			0 *			3 *			0 *			0 *			
S9 Mix (-)	0	99	89	86	13	10	11	15	27	21	17	30	14	13	7	5	
		( 91 $\pm$ 6.8 )			( 11 $\pm$ 1.5 )			( 21 $\pm$ 6.0 )			( 20 $\pm$ 8.5 )			( 8 $\pm$ 4.2 )			
	200	85 *			12			17			32			7 *			
	400	0 *			0 *			5 *			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			
	Number of colonies / plate	788	789	818	230	222	250	531	583	549	238	268	300	176	214	250	
		( 798 $\pm$ 17.0 )			( 234 $\pm$ 14.4 )			( 554 $\pm$ 26.4 )			( 269 $\pm$ 31.0 )			( 213 $\pm$ 37.0 )			

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.

Table 3. Results of bacterial reverse mutation assay ( I ) with 4-(1-Methylpropyl) phenol

With (+) or without (-) S9 Mix	Test substance dose ( $\mu\text{g}$ / 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	99	95	91	9	21	14	13	15	17	21	18	26	7	10	12	
		( 95 $\pm$ 4.0 )			( 15 $\pm$ 6.0 )			( 15 $\pm$ 2.0 )			( 22 $\pm$ 4.0 )			( 10 $\pm$ 2.5 )			
	6.25	125	122	121	7	16	10	20	11	23	18	17	30	5	4	9	
		( 123 $\pm$ 2.1 )			( 11 $\pm$ 4.6 )			( 18 $\pm$ 6.2 )			( 22 $\pm$ 7.2 )			( 6 $\pm$ 2.6 )			
	12.5	124	130	124	17	18	11	21	16	18	22	18	16	8	8	6	
		( 126 $\pm$ 3.5 )			( 15 $\pm$ 3.8 )			( 18 $\pm$ 2.5 )			( 19 $\pm$ 3.1 )			( 7 $\pm$ 1.2 )			
	25	122	118	125	23	15	17	21	13	14	20	21	29	8	5	5	
		( 122 $\pm$ 3.5 )			( 18 $\pm$ 4.2 )			( 16 $\pm$ 4.4 )			( 23 $\pm$ 4.9 )			( 6 $\pm$ 1.7 )			
50	138	139	112	14	15	12	21	23	19	20	22	23	8	9	8		
	( 130 $\pm$ 15.3 )			( 14 $\pm$ 1.5 )			( 21 $\pm$ 2.0 )			( 22 $\pm$ 1.5 )			( 8 $\pm$ 0.6 )				
100	137	124	116	25	14	12	8	17	22	17	17	21	9	15	9		
	( 126 $\pm$ 10.6 )			( 17 $\pm$ 7.0 )			( 16 $\pm$ 7.1 )			( 18 $\pm$ 2.3 )			( 11 $\pm$ 3.5 )				
200	133 *	105 *	118 *	13 *	5 *	10 *	14 *	19 *	24 *	21 *	25 *	16 *	9 *	5 *	6 *		
	( 119 $\pm$ 14.0 )			( 9 $\pm$ 4.0 )			( 19 $\pm$ 5.0 )			( 21 $\pm$ 4.5 )			( 7 $\pm$ 2.1 )				
S9Mix (+)	0	118	117	120	15	17	13	20	20	18	26	33	30	15	9	11	
		( 118 $\pm$ 1.5 )			( 15 $\pm$ 2.0 )			( 19 $\pm$ 1.2 )			( 30 $\pm$ 3.5 )			( 12 $\pm$ 3.1 )			
	12.5	137	153	141	11	13	12	21	23	26	33	31	41	16	15	12	
		( 144 $\pm$ 8.3 )			( 12 $\pm$ 1.0 )			( 23 $\pm$ 2.5 )			( 35 $\pm$ 5.3 )			( 14 $\pm$ 2.1 )			
	25	152	146	147	8	16	14	19	22	20	32	24	48	12	12	10	
		( 148 $\pm$ 3.2 )			( 13 $\pm$ 4.2 )			( 20 $\pm$ 1.5 )			( 35 $\pm$ 12.2 )			( 11 $\pm$ 1.2 )			
	50	159	137	158	13	17	10	28	23	29	28	34	39	14	17	11	
		( 151 $\pm$ 12.4 )			( 13 $\pm$ 3.5 )			( 27 $\pm$ 3.2 )			( 34 $\pm$ 5.5 )			( 14 $\pm$ 3.0 )			
100	169	127	159	18	8	20	26	25	29	34	39	30	16	18	13		
	( 152 $\pm$ 21.9 )			( 15 $\pm$ 6.4 )			( 27 $\pm$ 2.1 )			( 34 $\pm$ 4.5 )			( 16 $\pm$ 2.5 )				
200	160	149	165	20	16	20	22	21	19	32	37	32	20	20	12		
	( 158 $\pm$ 8.2 )			( 19 $\pm$ 2.3 )			( 21 $\pm$ 1.5 )			( 34 $\pm$ 2.9 )			( 17 $\pm$ 4.6 )				
400	127 *	120 *	124 *	14 *	14 *	9 *	30 *	26 *	24 *	24 *	26 *	31 *	8 *	12 *	14 *		
	( 124 $\pm$ 3.5 )			( 12 $\pm$ 2.9 )			( 27 $\pm$ 3.1 )			( 27 $\pm$ 3.6 )			( 11 $\pm$ 3.1 )				
Positive control S9 Mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA			
	Dose ( $\mu\text{g}$ / plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80			
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA			
	Dose ( $\mu\text{g}$ / plate)	1			2			10			0.5			2			
	Number of colonies / plate	512	557	536	254	285	294	106	116	112	581	533	515	2966	2181	2986	
		( 535 $\pm$ 22.5 )			( 278 $\pm$ 21.0 )			( 111 $\pm$ 5.0 )			( 543 $\pm$ 34.1 )			( 2711 $\pm$ 459.1 )			
	Number of colonies / plate	576	636	595	154	174	178	605	564	576	254	200	151	205	182	216	
		( 602 $\pm$ 30.7 )			( 169 $\pm$ 12.9 )			( 582 $\pm$ 21.1 )			( 202 $\pm$ 51.5 )			( 201 $\pm$ 17.3 )			

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.

Table 4. Results of bacterial reverse mutation assay ( II ) with 4-(1-Methylpropyl) phenol

With (+) or without (-) S9 Mix	Test substance dose ( $\mu\text{g}$ / 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	145	142	146	16	20	9	17	13	14	23	32	36	3	10	8	
		( 144 $\pm$ 2.1 )			( 15 $\pm$ 5.6 )			( 15 $\pm$ 2.1 )			( 30 $\pm$ 6.7 )			( 7 $\pm$ 3.6 )			
	6.25	130	123	110	20	9	8	14	19	17	21	25	27	4	12	6	
		( 121 $\pm$ 10.1 )			( 12 $\pm$ 6.7 )			( 17 $\pm$ 2.5 )			( 24 $\pm$ 3.1 )			( 7 $\pm$ 4.2 )			
	12.5	122	168	115	15	11	12	19	17	13	33	22	25	9	7	5	
		( 115 $\pm$ 7.0 )			( 13 $\pm$ 2.1 )			( 16 $\pm$ 3.1 )			( 27 $\pm$ 5.7 )			( 7 $\pm$ 2.0 )			
	25	117	121	147	13	16	16	14	10	15	25	28	28	8	9	8	
		( 128 $\pm$ 16.3 )			( 15 $\pm$ 1.7 )			( 13 $\pm$ 2.6 )			( 27 $\pm$ 1.7 )			( 8 $\pm$ 0.6 )			
50	126	139	104	14	12	5	11	18	17	19	28	27	6	7	10		
	( 123 $\pm$ 17.7 )			( 10 $\pm$ 4.7 )			( 15 $\pm$ 3.8 )			( 25 $\pm$ 4.9 )			( 8 $\pm$ 2.1 )				
100	140	114	124	15	22	12	16	20	17	16	32	18	9	7	5		
	( 126 $\pm$ 13.1 )			( 16 $\pm$ 5.1 )			( 18 $\pm$ 2.1 )			( 22 $\pm$ 8.7 )			( 7 $\pm$ 2.0 )				
200	122 *	112 *	115 *	16 *	9 *	15 *	17 *	16 *	17 *	17 *	18 *	29 *	5 *	4 *	7 *		
	( 116 $\pm$ 5.1 )			( 13 $\pm$ 3.8 )			( 17 $\pm$ 0.6 )			( 21 $\pm$ 6.7 )			( 5 $\pm$ 1.5 )				
S9 Mix (+)	0	121	143	151	17	22	14	16	18	17	26	42	51	16	10	8	
		( 138 $\pm$ 15.5 )			( 18 $\pm$ 4.0 )			( 17 $\pm$ 1.0 )			( 40 $\pm$ 12.7 )			( 11 $\pm$ 4.2 )			
	12.5	134	145	150	18	19	10	18	23	28	38	31	28	10	9	9	
		( 143 $\pm$ 8.2 )			( 16 $\pm$ 4.9 )			( 23 $\pm$ 5.0 )			( 32 $\pm$ 5.1 )			( 9 $\pm$ 0.6 )			
	25	143	135	140	5	8	9	24	16	28	43	34	43	11	9	10	
		( 139 $\pm$ 4.0 )			( 7 $\pm$ 2.1 )			( 23 $\pm$ 6.1 )			( 40 $\pm$ 5.2 )			( 10 $\pm$ 1.0 )			
	50	144	120	129	18	9	9	18	18	26	27	32	38	10	8	6	
		( 131 $\pm$ 12.1 )			( 12 $\pm$ 5.2 )			( 21 $\pm$ 4.6 )			( 32 $\pm$ 5.5 )			( 8 $\pm$ 2.0 )			
100	146	132	135	10	6	6	22	26	17	41	40	34	10	4	4		
	( 138 $\pm$ 7.4 )			( 7 $\pm$ 2.3 )			( 22 $\pm$ 4.5 )			( 38 $\pm$ 3.8 )			( 6 $\pm$ 3.5 )				
200	117	121	146	11	11	12	15	17	27	25	30	32	8	10	6 *		
	( 128 $\pm$ 15.7 )			( 11 $\pm$ 0.6 )			( 20 $\pm$ 6.4 )			( 29 $\pm$ 3.6 )			( 8 $\pm$ 2.0 )				
400	99 *	100 *	58 *	8 *	3 *	13 *	11 *	17 *	19 *	5 *	3 *	19 *	0 *	4 *	3 *		
	( 86 $\pm$ 24.0 )			( 8 $\pm$ 5.0 )			( 16 $\pm$ 4.2 )			( 9 $\pm$ 8.7 )			( 2 $\pm$ 2.1 )				
Positive control	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA			
	Dose ( $\mu\text{g}$ / plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80			
S9 Mix (-)	Number of colonies / plate	468	451	435	132	150	134	203	224	245	606	703	692	2117	2234	2203	
		( 451 $\pm$ 16.5 )			( 139 $\pm$ 9.9 )			( 224 $\pm$ 21.0 )			( 667 $\pm$ 53.1 )			( 2185 $\pm$ 60.6 )			
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA			
	Dose ( $\mu\text{g}$ / plate)	1			2			10			0.5			2			
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	661	673	648	137	174	176	633	642	564	284	290	257	211	196	174	
		( 661 $\pm$ 12.5 )			( 162 $\pm$ 22.0 )			( 613 $\pm$ 42.7 )			( 277 $\pm$ 17.6 )			( 194 $\pm$ 18.6 )			

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.