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 μg/プレート の用量で、本試験は直接法では 6.25～200 μg/プレート、代謝活性化法では 12.5～400 μg/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[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℃、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ＭＰＰ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。

ＭＰＰ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㈱）に 50 mg/mℓ あるいは 40 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ＭＰＰの DMSO 溶液中での安定性試験を高濃度（15 mg/mℓ）および低濃度（60 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、４mg/mℓ 溶液の含量は既定濃度に対し、108～110%、62.5 μg/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㈱	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：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	0.2 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	ｸﾞﾙｺｰｽ	20 g
ﾘﾝ酸水素二ｶﾘｳﾑ	10 g	ﾊﾞｸﾄｱｶﾞｰ (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
塩化ﾏｸﾞﾈｼｳﾑ	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
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-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 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℃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 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ 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 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ 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 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ の用量でも認められた。そのため、200 および 400 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ 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 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ 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 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ で、それ以外の検定菌では 400 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ 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 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ、代謝活性化法では 400 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ 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 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ、代謝活性化法では 12.5～400 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ 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 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ、代謝活性化法では 400 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ 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 (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	120 124 123 (122 ± 2.1)	9 7 10 (9 ± 1.5)	19 11 14 (15 ± 4.0)	17 12 23 (17 ± 5.5)	16 9 8 (11 ± 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 *
S9Mix	0	122 119 110 (117 ± 6.2)	11 12 13 (12 ± 1.0)	14 12 13 (13 ± 1.0)	29 28 31 (29 ± 1.5)	17 10 9 (12 ± 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 (μg / plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	Number of colonies / plate	535 533 501 (523 ± 19.1)	205 181 196 (194 ± 12.1)	174 176 190 (180 ± 8.7)	504 523 487 (505 ± 18.0)	3239 3430 3577 (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 (454 ± 28.6)	277 228 191 (232 ± 43.1)	421 425 422 (423 ± 2.1)	240 202 208 (217 ± 20.4)	151 174 194 (173 ± 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 (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	122 112 110 (115 ± 6.4)	10 14 12 (12 ± 2.0)	17 16 29 (21 ± 7.2)	16 15 17 (16 ± 1.0)	11 9 5 (8 ± 3.1)
	200	45 *	3 *	5 *	0 *	5 *
	400	0 *	0 *	3 *	0 *	0 *
S9Mix (+)	0	99 89 86 (91 ± 6.8)	13 10 11 (11 ± 1.5)	15 27 21 (21 ± 6.0)	17 30 14 (20 ± 8.5)	13 7 5 (8 ± 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 (μg / plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	Number of colonies / plate	432 427 440 (433 ± 6.6)	156 160 185 (167 ± 15.7)	158 176 171 (168 ± 9.3)	583 563 592 (579 ± 14.8)	3533 3729 3659 (3640 ± 99.3)
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA
	Dose (μg / plate)	1	2	10	0.5	2
	Number of colonies / plate	788 789 818 (798 ± 17.0)	230 222 250 (234 ± 14.4)	531 583 549 (554 ± 26.4)	238 268 300 (269 ± 31.0)	176 214 250 (213 ± 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 (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	99 95 91 (95 ± 4.0)	9 21 14 (15 ± 6.0)	13 15 17 (15 ± 2.0)	21 18 26 (22 ± 4.0)	7 10 12 (10 ± 2.5)	
	6.25	125 122 121 (123 ± 2.1)	7 16 10 (11 ± 4.6)	20 11 23 (18 ± 6.2)	18 17 30 (22 ± 7.2)	5 4 9 (6 ± 2.6)	
	12.5	124 130 124 (126 ± 3.5)	17 18 11 (15 ± 3.8)	21 16 18 (18 ± 2.5)	22 18 16 (19 ± 3.1)	8 8 6 (7 ± 1.2)	
	25	122 118 125 (122 ± 3.5)	23 15 17 (18 ± 4.2)	21 13 14 (16 ± 4.4)	20 21 29 (23 ± 4.9)	8 5 5 (6 ± 1.7)	
	50	138 139 112 (130 ± 15.3)	14 15 12 (14 ± 1.5)	21 23 19 (21 ± 2.0)	20 22 23 (22 ± 1.5)	8 9 8 (8 ± 0.6)	
	100	137 124 116 (126 ± 10.6)	25 14 12 (17 ± 7.0)	8 17 22 (16 ± 7.1)	17 17 21 (18 ± 2.3)	9 15 9 (11 ± 3.5)	
	200	133 * 105 * 118 * (119 ± 14.0)	13 * 5 * 10 * (9 ± 4.0)	14 * 19 * 24 * (19 ± 5.0)	21 * 25 * 16 * (21 ± 4.5)	9 * 5 * 6 * (7 ± 2.1)	
S9Mix (+)	0	118 117 120 (118 ± 1.5)	15 17 13 (15 ± 2.0)	20 20 18 (19 ± 1.2)	26 33 30 (30 ± 3.5)	15 9 11 (12 ± 3.1)	
	12.5	137 153 141 (144 ± 8.3)	11 13 12 (12 ± 1.0)	21 23 26 (23 ± 2.5)	33 31 41 (35 ± 5.3)	16 15 12 (14 ± 2.1)	
	25	152 146 147 (148 ± 3.2)	8 16 14 (13 ± 4.2)	19 22 20 (20 ± 1.5)	32 24 48 (35 ± 12.2)	12 12 10 (11 ± 1.2)	
	50	159 137 158 (151 ± 12.4)	13 17 10 (13 ± 3.5)	28 23 29 (27 ± 3.2)	28 34 39 (34 ± 5.5)	14 17 11 (14 ± 3.0)	
	100	169 127 159 (152 ± 21.9)	18 8 20 (15 ± 6.4)	26 25 29 (27 ± 2.1)	34 39 30 (34 ± 4.5)	16 18 13 (16 ± 2.5)	
	200	160 149 165 (158 ± 8.2)	20 16 20 (19 ± 2.3)	22 21 19 (21 ± 1.5)	32 37 32 (34 ± 2.9)	20 20 12 (17 ± 4.6)	
	400	127 * 120 * 124 * (124 ± 3.5)	14 * 14 * 9 * (12 ± 2.9)	30 * 26 * 24 * (27 ± 3.1)	24 * 26 * 31 * (27 ± 3.6)	8 * 12 * 14 * (11 ± 3.1)	
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	512 557 536 (535 ± 22.5)	254 285 294 (278 ± 21.0)	106 116 112 (111 ± 5.0)	581 533 515 (543 ± 34.1)	2966 2181 2986 (2711 ± 459.1)	
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose (μg / plate)	1	2	10	0.5	2	
	Number of colonies / plate	576 636 595 (602 ± 30.7)	154 174 178 (169 ± 12.9)	605 564 576 (582 ± 21.1)	254 200 151 (202 ± 51.5)	205 182 216 (201 ± 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 (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	145 142 146 (144 ± 2.1)	16 20 9 (15 ± 5.6)	17 13 14 (15 ± 2.1)	23 32 36 (30 ± 6.7)	3 10 8 (7 ± 3.6)	
	6.25	130 123 110 (121 ± 10.1)	20 9 8 (12 ± 6.7)	14 19 17 (17 ± 2.5)	21 25 27 (24 ± 3.1)	4 12 6 (7 ± 4.2)	
	12.5	122 108 115 (115 ± 7.0)	15 11 12 (13 ± 2.1)	19 17 13 (16 ± 3.1)	33 22 25 (27 ± 5.7)	9 7 5 (7 ± 2.0)	
	25	117 121 147 (128 ± 16.3)	13 16 16 (15 ± 1.7)	14 10 15 (13 ± 2.6)	25 28 28 (27 ± 1.7)	8 9 8 (8 ± 0.6)	
	50	126 139 104 (123 ± 17.7)	14 12 5 (10 ± 4.7)	11 18 17 (15 ± 3.8)	19 28 27 (25 ± 4.9)	6 7 10 (8 ± 2.1)	
	100	140 114 124 (126 ± 13.1)	15 22 12 (16 ± 5.1)	16 20 17 (18 ± 2.1)	16 32 18 (22 ± 8.7)	9 7 5 (7 ± 2.0)	
	200	122 * 112 * 115 * (116 ± 5.1)	16 * 9 * 15 * (13 ± 3.8)	17 * 16 * 17 * (17 ± 0.6)	17 * 18 * 29 * (21 ± 6.7)	5 * 4 * 7 * (5 ± 1.5)	
S9Mix (+)	0	121 143 151 (138 ± 15.5)	17 22 14 (18 ± 4.0)	16 18 17 (17 ± 1.0)	26 42 51 (40 ± 12.7)	16 10 8 (11 ± 4.2)	
	12.5	134 145 150 (143 ± 8.2)	18 19 10 (16 ± 4.9)	18 23 28 (23 ± 5.0)	38 31 28 (32 ± 5.1)	10 9 9 (9 ± 0.6)	
	25	143 135 140 (139 ± 4.0)	5 8 9 (7 ± 2.1)	24 16 28 (23 ± 6.1)	43 34 43 (40 ± 5.2)	11 9 10 (10 ± 1.0)	
	50	144 120 129 (131 ± 12.1)	18 9 9 (12 ± 5.2)	18 18 26 (21 ± 4.6)	27 32 38 (32 ± 5.5)	10 8 6 (8 ± 2.0)	
	100	146 132 135 (138 ± 7.4)	10 6 6 (7 ± 2.3)	22 26 17 (22 ± 4.5)	41 40 34 (38 ± 3.8)	10 4 4 (6 ± 3.5)	
	200	117 121 146 (128 ± 15.7)	11 11 12 (11 ± 0.6)	15 17 27 (20 ± 6.4)	25 30 32 (29 ± 3.6)	8 10 6 * (8 ± 2.0)	
	400	99 * 100 * 58 * (86 ± 24.0)	8 * 3 * 13 * (8 ± 5.0)	11 * 17 * 19 * (16 ± 4.2)	5 * 3 * 19 * (9 ± 8.7)	0 * 4 * 3 * (2 ± 2.1)	
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	468 451 435 (451 ± 16.5)	132 150 134 (139 ± 9.9)	203 224 245 (224 ± 21.0)	606 703 692 (667 ± 53.1)	2117 2234 2203 (2185 ± 60.6)	
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose (μg / plate)	1	2	10	0.5	2	
	Number of colonies / plate	661 673 648 (661 ± 12.5)	137 174 176 (162 ± 22.0)	633 642 564 (613 ± 42.7)	284 290 257 (277 ± 17.6)	211 196 174 (194 ± 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.