



1,4-ジブロモベンゼン 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】

1,4-ジブロモベンゼン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が 12.5~5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、代謝活性化法が 50~5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で、本試験では直接法が 6.3~400 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、代謝活性化法では 12.5~800 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 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、1,4-ジブロモベンゼンは、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、難分解性既存化学物質の1つである、1,4-ジプロモベンゼンについて、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 *uvrA*
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, ロット番号 : 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℃、約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〕

1, 4-ジブロモベンゼン (CAS No. 106-37-6、以下D B Bと略) は、分子量 235.9の芳香
性の白色結晶である。純度 99.9%のもの (ロット番号 :) を

から供与された。被験物質は、使用時まで室温に保管した。被験物質は、
この状態で安定あることが製造者によって確認されている。

D B Bは、アセトン (ロット番号 : DSR3251 および DSM4173 、和光純薬工業(株)) を用
いて最高濃度の溶液を調製した後、同溶媒で更に希釈したものを、速やかに試験に用いた。

秦野研究所においてD B Bのアセトン溶液中での安定性試験を、本試験における最高濃
度 (8 mg/ml) および最低濃度 (16 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 100%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、8000 µg/ml
溶液の含量は既定濃度に対し、100~103%、62.5 µg/ml 溶液は、104~109%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、DBB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 : フリルアマイド	(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 : DJ040IHおよび DJ050JH, 1992年9月4日および10月12日製造、本試験においては、ロット番号 : DJ060KH, 1992年11月10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
リン酸水素二カウム	10 g	バクアガー (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 μ mol
塩化マグネシウム	8 μ mol	NADPH	4 μ mol
塩化カリウム	33 μ mol	0.2M リン酸緩衝液 (pH 7.4)	0.5 ml
グルコース・6リン酸	5 μ mol		

** : 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日製造およびRAA-285、1992年11月20日製造)を -80°C で凍結保存し、用時に解凍した。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°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。D B B について、50～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で試験を実施したところ、すべての検定菌において、直接法では 150 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で、代謝活性化法では 500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で抗菌性が認められた。そこで、直接法では最高用量を 200 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、代謝活性化法では 800 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ を最高用量とし、公比 2 で 5 段階を設定して、追加試験を行ったが TA100 の直接法、代謝活性化法および TA1537 の代謝活性化法において強い抗菌性が認められた。

以上の結果から、本試験における最高用量をすべての検定菌において、直接法では 400 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、代謝活性化法では 800 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ とし、公比 2 で 7 用量 (TA100 のみは直接法が 9 用量、代謝活性化法が 10 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。D B B について、直接法では 6.3～400 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ (TA100 の 1 回目は 1.6～400 $\mu\text{g}/\text{プレート}$)、代謝活性化法では 12.5～800 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ (TA100 の 1 回目は 1.6～800 $\mu\text{g}/\text{プレート}$) 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、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。

D B B 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、D B B 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 1,4-dibromobenzene

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	161	118	136	13	17	18	18	14	24	35	28	45	10	13	11	
		(138 \pm 21.6)			(16 \pm 2.6)			(19 \pm 5.0)			(36 \pm 8.5)			(11 \pm 1.5)			
	50	152			14			28			45			8			
	150	0 *			0 *			0 *			0 *			0 *			
	500	0 *			0 *			0 *			0 *			0 *			
	1500	0 *			0 *			0 *			0 *			0 *			
	5000	0 *			0 *			0 *			0 *			0 *			
S9Mix (+)	0	143	137	158	13	14	19	27	18	29	39	51	35	7	12	13	
		(146 \pm 10.8)			(15 \pm 3.2)			(25 \pm 5.9)			(42 \pm 8.3)			(11 \pm 3.2)			
	50	133			23			34			36			16			
	150	107			18			34			20			10			
	500	67 *			14 *			27 *			13 *			8 *			
	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			
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA			
	Dose (μg / plate)	1			2			10			0.5			2			
	Number of colonies / plate	468	437	479	310	281	316	151	126	125	648	669	690	1939	1933	2017	
		(461 \pm 21.8)			(302 \pm 18.7)			(134 \pm 14.7)			(669 \pm 21.0)			(1963 \pm 46.9)			
	Number of colonies / plate	370	377	394	229	219	203	902	894	910	305	336	340	198	189	226	
		(380 \pm 12.3)			(217 \pm 13.1)			(902 \pm 8.0)			(327 \pm 19.2)			(204 \pm 19.3)			

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 2. Results of preliminary cytotoxicity test in bacterial reverse mutation assay with 1,4-dibromobenzene

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			
S9Mix (-)	0	129	123	120	15	15	12	31	29	23	29	55	46	5	12	6	
		(124 \pm 4.6)			(14 \pm 1.7)			(28 \pm 4.2)			(43 \pm 13.2)			(8 \pm 3.8)			
	12.5	113			26			21			48			6			
	25	132			12			31			39			9			
	50	116 *			5			24			31			10			
	100	113 *			8			21			33			6			
	200	98 *			12			17			18			7 *			
S9Mix (+)	0	125	132	129	15	12	16	18	39	25	56	41	38	9	12	12	
		(129 \pm 3.5)			(14 \pm 2.1)			(27 \pm 10.7)			(45 \pm 9.6)			(11 \pm 1.7)			
	50	117			12			21			78			22			
	100	114			14			14			54			16			
	200	126 *			11			32			42			10 *			
	400	105 *			16			20 *			20 *			16 *			
	800	90 *			7 *			22 *			22 *			10 *			
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	410	373	394	122	126	106	168	134	154	545	502	555	1818	1698	1982	
		(392 \pm 18.6)			(118 \pm 10.6)			(152 \pm 17.1)			(534 \pm 28.2)			(1833 \pm 142.6)			
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	439	599	620	211	181	192	860	829	726	235	277	222	171	175	155	
		(553 \pm 99.0)			(195 \pm 15.2)			(805 \pm 70.1)			(245 \pm 28.7)			(167 \pm 10.6)			

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.

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

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	128	165	170	14	12	20	20	23	25	19	26	24	4	4	7	(154 \pm 22.9)	(15 \pm 4.2)	(23 \pm 2.5)	(23 \pm 3.6)	(5 \pm 1.7)
	1.6	176	126	156	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND					
	3.1	156	147	146	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND					
	6.3	142	152	140	4	12	15	27	24	22	28	34	26	4	7	9	(145 \pm 6.4)	(10 \pm 5.7)	(24 \pm 2.5)	(29 \pm 4.2)	(7 \pm 2.5)
	12.5	141	139	140	19	9	11	25	22	16	27	21	30	10	9	6	(140 \pm 1.0)	(13 \pm 5.3)	(21 \pm 4.6)	(26 \pm 4.6)	(8 \pm 2.1)
	25	128	135	117	21	24	12	18	26	25	23	27	27	10	5	1	(127 \pm 9.1)	(19 \pm 6.2)	(23 \pm 4.4)	(26 \pm 2.3)	(5 \pm 4.5)
	50	150	143	129	12	15	17	20	23	25	32	23	22	5	6	5	(141 \pm 10.7)	(15 \pm 2.5)	(23 \pm 2.5)	(26 \pm 5.5)	(5 \pm 0.6)
	100	124	120	127	7	11	0*	18	17	22	21	25	21	7	11	6	(124 \pm 3.5)	(6 \pm 5.6)	(19 \pm 2.6)	(22 \pm 2.3)	(8 \pm 2.6)
	200	0*	112*	80*	0*	10*	0*	14*	14*	10*	11*	14*	24*	4*	5*	7*	(64 \pm 57.7)	(3 \pm 5.8)	(13 \pm 2.3)	(16 \pm 6.8)	(5 \pm 1.5)
	400	86*	32*	0*	4*	0*	7*	21*	9*	21*	12*	17*	15*	0*	0*	0*	(39 \pm 43.5)	(4 \pm 3.5)	(17 \pm 6.9)	(15 \pm 2.5)	(0 \pm 0.0)
S9Mix (+)	0	142	129	130	12	10	15	30	29	15	33	37	30	11	14	8	(134 \pm 7.2)	(12 \pm 2.5)	(25 \pm 8.4)	(33 \pm 3.5)	(11 \pm 3.0)
	1.6	152	165	152	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND					
	3.1	160	147	171	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND					
	6.3	151	163	129	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND					
	12.5	149	154	145	18	10	13	26	36	38	43	42	37	11	9	14	(149 \pm 4.5)	(14 \pm 4.0)	(33 \pm 6.4)	(41 \pm 3.2)	(11 \pm 2.5)
	25	131	136	161	14	15	16	23	29	28	35	43	35	12	9	13	(143 \pm 16.1)	(15 \pm 1.0)	(27 \pm 3.2)	(38 \pm 4.6)	(11 \pm 2.1)
	50	156	134	144	10	12	17	38	23	32	31	29	27	10	11	15	(145 \pm 11.0)	(13 \pm 3.6)	(31 \pm 7.5)	(29 \pm 2.0)	(12 \pm 2.6)
	100	138	125	130	14	6	13	26	24	32	47	29	29	11	15	15	(131 \pm 6.6)	(11 \pm 4.4)	(27 \pm 4.2)	(35 \pm 10.4)	(14 \pm 2.3)
	200	139*	133*	118*	16	12	12	32	27	24	47	31	26	11	15	13	(130 \pm 10.8)	(13 \pm 2.3)	(28 \pm 4.0)	(35 \pm 11.0)	(13 \pm 2.0)
400	119*	132*	90*	6*	16*	12*	27	25	23*	21*	23*	14*	12*	18*	12*	(114 \pm 21.5)	(11 \pm 5.0)	(25 \pm 2.0)	(19 \pm 4.7)	(14 \pm 3.5)	
800	118*	110*	110*	14*	9*	6*	22*	22*	29*	24*	25*	12*	16*	10*	13*	(113 \pm 4.6)	(10 \pm 4.0)	(24 \pm 4.0)	(20 \pm 7.2)	(13 \pm 3.0)	
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	541	511	574	147	155	195	194	156	134	809	792	868	2215	2272	2464	(542 \pm 31.5)	(166 \pm 25.7)	(161 \pm 30.4)	(823 \pm 39.9)	(2317 \pm 130.5)
	Number of colonies / plate	938	827	882	183	188	212	912	958	957	381	360	393	298	276	276	(882 \pm 55.5)	(194 \pm 15.5)	(942 \pm 26.3)	(378 \pm 16.7)	(283 \pm 12.7)

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.

ND: Not done

Table 4. Results of bacterial reverse mutation assay (II) with 1,4-dibromobenzene

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	139	155	128	15	16	6	28	21	23	19	23	23	5	12	8	
		(141 \pm 13.6)			(12 \pm 5.5)			(24 \pm 3.6)			(22 \pm 2.3)			(8 \pm 3.5)			
	6.3	123	134	138	15	11	11	30	28	25	21	22	29	10	7	9	
		(132 \pm 7.8)			(12 \pm 2.3)			(28 \pm 2.5)			(24 \pm 4.4)			(9 \pm 1.5)			
	12.5	137	125	132	15	12	12	29	26	23	23	36	12	10	6	3	
		(131 \pm 6.0)			(13 \pm 1.7)			(26 \pm 3.0)			(24 \pm 12.0)			(6 \pm 3.5)			
	25	116	115	116	15	14	11	26	24	26	28	29	16	5	7	5	
		(116 \pm 0.6)			(13 \pm 2.1)			(25 \pm 1.2)			(24 \pm 7.2)			(6 \pm 1.2)			
50	135	123	133	17	13	9	34	26	25	16	19	28	4	7	9		
	(130 \pm 6.4)			(13 \pm 4.0)			(28 \pm 4.9)			(21 \pm 6.2)			(7 \pm 2.5)				
100	119 *	123 *	115 *	12	16	11	15	21	17	16	13	27	8	3	6		
	(119 \pm 4.0)			(13 \pm 2.6)			(18 \pm 3.1)			(19 \pm 7.4)			(6 \pm 2.5)				
200	0 *	0 *	0 *	8 *	13 *	8 *	15 *	9 *	15 *	22 *	12 *	0 *	7 *	2 *	4 *		
	(0 \pm 0.0)			(10 \pm 2.9)			(13 \pm 3.5)			(11 \pm 11.0)			(4 \pm 2.5)				
400	0 *	0 *	0 *	8 *	0 *	0 *	7 *	21 *	21 *	3 *	0 *	0 *	7 *	3 *	9 *		
	(0 \pm 0.0)			(3 \pm 4.6)			(16 \pm 8.1)			(1 \pm 1.7)			(6 \pm 3.1)				
S9Mix (+)	0	149	143	151	13	17	15	18	22	14	35	37	31	8	13	6	
		(148 \pm 4.2)			(15 \pm 2.0)			(18 \pm 4.0)			(34 \pm 3.1)			(9 \pm 3.6)			
	12.5	127	110	134	14	22	16	23	29	25	28	33	23	11	18	9	
		(124 \pm 12.3)			(17 \pm 4.2)			(26 \pm 3.1)			(28 \pm 5.0)			(13 \pm 4.7)			
	25	141	152	131	16	11	11	24	39	25	25	28	36	22	18	10	
		(141 \pm 10.5)			(13 \pm 2.9)			(29 \pm 8.4)			(30 \pm 5.7)			(17 \pm 6.1)			
	50	145	115	118	13	11	12	22	21	14	27	39	27	9	16	7	
		(126 \pm 16.5)			(12 \pm 1.0)			(19 \pm 4.4)			(31 \pm 6.9)			(11 \pm 4.7)			
100	123	155	127	17	13	17	35	24	19	27	25	15	9	14	9		
	(135 \pm 17.4)			(16 \pm 2.3)			(26 \pm 8.2)			(22 \pm 6.4)			(11 \pm 2.9)				
200	132 *	124 *	137 *	10	11	9	20	11	13	17	14	26	9 *	9 *	11 *		
	(131 \pm 6.6)			(10 \pm 1.0)			(15 \pm 4.7)			(19 \pm 6.2)			(10 \pm 1.2)				
400	126 *	77 *	86 *	0 *	2 *	3 *	8 *	11 *	13 *	0 *	13 *	13 *	9 *	0 *	0 *		
	(96 \pm 26.1)			(2 \pm 1.5)			(11 \pm 2.5)			(9 \pm 7.5)			(3 \pm 5.2)				
800	80 *	79 *	70 *	7 *	2 *	7 *	12 *	14 *	20 *	18 *	17 *	26 *	0 *	0 *	0 *		
	(76 \pm 5.5)			(5 \pm 2.9)			(15 \pm 4.2)			(20 \pm 4.9)			(0 \pm 0.0)				
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	506	535	507	147	148	154	155	166	164	774	824	787	2303	2406	2413	
		(516 \pm 16.5)			(150 \pm 3.8)			(162 \pm 5.9)			(795 \pm 25.9)			(2374 \pm 61.6)			
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	866	875	884	270	254	292	1025	1045	1065	392	376	406	278	263	273	
		(875 \pm 9.0)			(272 \pm 19.1)			(1045 \pm 20.0)			(391 \pm 15.0)			(271 \pm 7.6)			

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.