

微生物氧化萘制取水杨酸

法幼华 徐诗伟 梁家驊

(中国科学院微生物研究所, 北京)

钟湖兴 王少芬 唐 炯 张利通

李厚鑫 黄淑芳 崔福全 陈国均

(北京焦化厂焦化研究室, 北京)

1. 在以萘为唯一碳源的培养基中, 用富集培养法, 从 172 个试样中分离得到 284 株利用萘的细菌。其中多数菌能由萘生成水杨酸。

2. 鉴定了两株生长较好, 产酸稳定的菌株 AS 1.593 和 AS 1.860, 根据伯基手册, 前者属卵形假单胞杆菌 (*Pseudomonas ovalis*), 后者属铜绿色假单胞杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)。这两株菌低温保存一年半后, 产酸能力没有下降。

3. 进行了 AS 1.860 累积水杨酸的条件试验。发现发酵培养基的起始 pH 为微碱性并具有较强的缓冲能力时, 有利于水杨酸的累积。氨态氮对产酸影响不大。铁盐对形成水杨酸是必需的。为了防止水杨酸进一步氧化, 必须使发酵液保持过量的萘。通气只能加速水杨酸的生成, 但不影响水杨酸的累积总量。发酵的最适温度为 28℃ 左右。在适宜的条件下, AS 1.860 菌株的产酸浓度每升达 19 克以上, 转化率为耗萘量的 85%。

水杨酸(邻羟基苯甲酸)是生产医药、香料、染料等的化工原料, 也用于生产橡胶防老剂、合成树脂等。当前国内外水杨酸的生产均采用化学合成法, 要求设备比较复杂, 不利于中小地方工业推广使用, 因此有必要寻找一种更可行的生产途径。

国外, 以萘为原料利用微生物氧化制取水杨酸的研究已有报道。1943 年斯特雷温斯基(Strawinski, R. J.)和斯通(Stone, R. W.)^[1]首先从微生物氧化萘的培养液中分离得到了水杨酸, 从而为水杨酸的生产提供了一条新线索。以后又在氧化萘生成水杨酸菌种的分离^[2], 产酸条件^[2-9], 代谢途径^[10-12], 以及发酵新工艺的应用^[13, 14]等方面进行了研究。近来, 墨西哥报道了, 由萘生成水杨酸的中间工厂规模试验结果, 收率为每升 15 克, 最高转化率接近 70%^[15]。

但迄今为止尚未见到正式工业生产的报道。

随着我国焦化工业和石油工业的发展, 萘的来源将日益增多。鉴于萘的价格低廉, 用微生物发酵法生产水杨酸设备要求也比化学合成法简单, 便于推广, 因而这可能是我国水杨酸生产的一条新途径。过去我国没有这方面的研究。本文着重报道氧化萘生成水杨酸的菌种分离、筛选以及产水杨酸发酵条件的研究。

材料与方法

一、菌种的分离

分离菌株试样 采自国内各主要炼焦化工厂, 少数取自化工、染料、香料、制药等工厂以及

本文 1973 年 6 月 11 日收到。

城市街道。

分离筛选培养基 基本上用克劳斯迈耶(Klausmerier)等^[4]的无机盐培养基,只是变更了个别成份的含量。其组成为:在1升自来水中含有 NH_4Cl 1克, K_2HPO_4 20克, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5克, $\text{MnCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.2克, $\text{CaCO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.5克, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5克, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, KI 微量,自然pH, 8磅30分钟灭菌。接种前直接加入2%粉末状茶(工业品,纯度97—98%)。分离用的固体培养基是在上述培养基内添加2%琼脂。茶是在固体培养基溶化时按茶浓度的要求加入茶悬浮液(茶悬浮液的制备:在无茵情况下研磨茶并加入少量无菌水制成悬浮液,必要时也可加入少量吐温20),混匀后立即制平板或茶斜面。

种子培养基的组成 NH_4Cl 1克, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 10克, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1克, KCl 0.1克,自来水1升,自然pH, 8磅30分钟灭菌。接种前加入预先用紫外灯灭过茵的粉末状茶。

发酵培养基 培养基I主要参考韦斯利(Wessley)^[4]的高浓度 Na_2SO_4 的培养基,组成如下:每升含 Na_2SO_4 30克, CaCO_3 25克, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1克, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.5克, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1克, KCl 0.1克。培养基II是本文产酸条件的基础培养基,其组成以克劳斯迈耶等^[4]所提出的用高浓度磷酸盐缓冲培养基为根据,在这基础上并进行了适当的简化,其组成为每升含 NH_4Cl 1克, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 20克, NaCl 10克, CaCO_3 10克, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1克, KCl 0.1克。培养基III系参考石仓等^[2]以尿素为氮源并用它起中和酸的作用的尿素培养基,每升含尿素3克, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3克, NaCl 10克, CaCO_3 5克, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1克, KCl 0.1克。所有培养基均采用自来水配制,其成份也都可以工业品代替,采用自然pH,不需灭菌。接种时加入3%粉末状茶。

分离方法 按一般富集培养法,取分离试样0.5克,接种后,振荡培养2天,将生长好的样品转接到新的培养基内继续培养,然后用平板法分离、纯化,挑取单菌落。

二、培养方法

菌种筛选是用200毫升三角瓶内加20毫升培养基,振荡培养2天。摇瓶条件试验在500毫

升三角瓶(内盛50毫升培养液)内进行。振荡培养3天,用培养20小时左右的种子液接种,接种量5%,摇床转速为180转/分,振幅60毫米。深层通气发酵的规模为50升和500升发酵罐,实容分别为28升和340升,转速为310转/分,空气流量按体积比为1:1,罐压1公斤/厘米²,其它条件与摇瓶培养相同。所有培养试验均在28℃进行。

三、测定方法和产物的提取

细胞增殖情况采用平板法计算每毫升的活菌数,以及测定细胞干重的方法。残余茶用乙醚萃取发酵液的沉淀蒸去乙醚,称重测得残余茶量。水杨酸的定性测定用纸上层析法,展开剂为:1)2%醋酸水溶液;2)吡啶:正丁醇:饱和氯化钠溶液=1:1:2(以体积计)。显色剂:1)重氮化对氨基苯磺酸溶液(0.05克重氮化对氨基苯磺酸溶于10毫升10%碳酸钠溶液中,需使用时新配制),水杨酸在米色背底上显黄色斑点;2)1% FeCl_3 乙醇溶液,水杨酸在黄色背底上显紫色斑点。此外,还可在紫外线下(波长253.7毫微米)观察萤光反应,水杨酸具有紫罗兰色萤光。定量测定用斯内尔(Snell, F. D.)等^[14]的比色法,即根据水杨酸与 $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ 的颜色反应。

发酵液经离心除去菌体及未利用的茶,然后用盐酸酸化,则得到结晶水杨酸。

菌种的分离和鉴定*

一、菌种分离

为了得到利用茶的微生物,采用以茶为唯一碳源的分离培养基进行2次富集培养。如有利用茶的菌存在,一般培养液的pH下降,颜色由茶色到褐色。共进行了172个试样的富集培养,其中只有65个试样具有利用茶的微生物。从这些试样的培养液中,分离到284株利用茶的细菌。我们发现,这些利用茶的细菌的存在,与其生活环境有密切关系。分离出利用茶的细菌的65个试样,均采自各焦化厂或有存放

* 中国科学院微生物研究所一室细菌组协助进行鉴定,特此致谢。

萘、蒽等多环芳烃仓库的化工厂或染料厂; 未分离出萘细菌的试样, 一般与多环芳烃没有接触过(表 1)。这可能是和微生物对环境条件的适应有关, 也为今后芳烃氧化菌的分离提供了一条线索。

表 1 从不同试样中分离菌种的结果

来 源	试 样			分离菌株 数
	富集总数	有 萘 细菌数	%	
焦化厂 A	19	11	57.9	61
” B	14	7	50.0	31
” C	20	6	30.0	32
” D	10	2	20.0	10
” E	14	7	50.0	42
” F	5	2	40.0	13
” G	22	9	21.9	29
” H	37	14	37.8	39
染料厂 I	9	1	11.1	2
” II	3	2	66.7	7
化工厂 I	7	4	57.1	18
” II	2	0	0	0
制药厂	1	0	0	0
香料厂 a	2	0	0	0
” b	2	0	0	0
” c	1	0	0	0
沈阳街道	3	0	0	0
北京街道	1	0	0	0
总 计	172	65	38.4	284

本文中所指的菌株 AS 1.593 和 AS 1.860 分别系由焦化厂 A 和 C 的土壤试样中分离得到的。

二、产水杨酸菌种的筛选

将上面所分离到的利用萘的细菌, 在摇瓶振荡培养 2 天, 多数培养液纸上层析与标准水杨酸具有同一 R_f 值的斑点。测定了这些菌株的产酸量, 发现大部分菌株产酸在 1% 以上, 其中有十余株酸量超过 1.5%。同时发现, 有些菌株经培养后, 虽然培养液的 pH 值下降, 颜色变深, 但不产生水杨酸, 而产生若干与水杨酸 R_f 值不同的斑点, 这些萘的代谢产物, 将在今后的工作中鉴定。

三、两株产水杨酸菌 AS 1.593 和 AS1.860 的鉴定

从产水杨酸的菌株中, 挑选了两株生长良好、产酸稳定的细菌, AS 1.593 和 AS 1.860 进行了微生物学特性的研究。

AS 1.593 细胞杆状, 端圆, 革兰氏染色阴性, 单个或成对排列, $0.6 \times 1.0-2.2$ 微米, 端生鞭毛 2—3 根, 运动(图 1)。在肉汁平板上菌落圆形, 光滑, 边缘整齐, 透明, 乳脂色。在肉汁斜面上菌苔光滑, 培养基有明显黄绿色, 具萤光。不液化明胶, 氧化葡萄糖。37℃ 生长良好。牛奶变碱性, 但无石蕊还原反应。

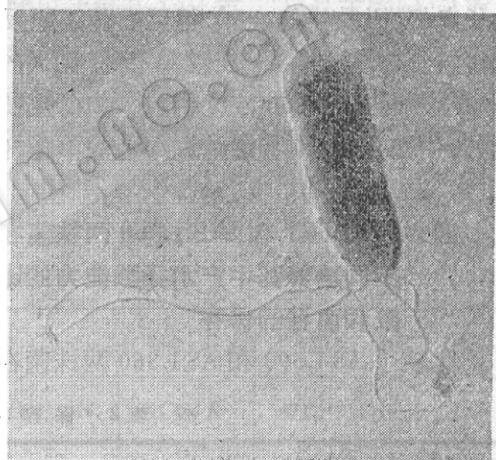


图 1 卵形假单胞杆菌(*Pseudomonas ovalis*) AS 1.593 细胞形态($\times 13000$)

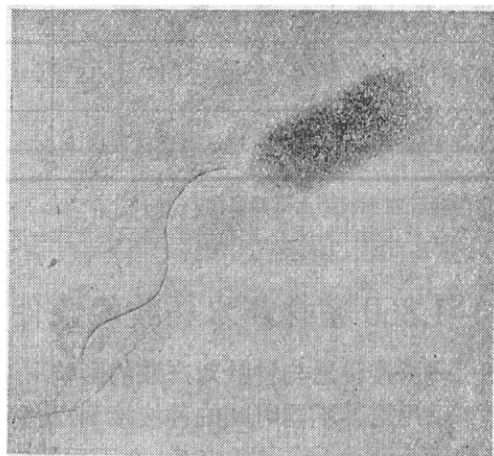


图 2 铜绿色假单胞杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*) AS 1.860 细胞形态($\times 13000$)

AS 1.860 细胞杆状,端圆,革兰氏染色阴性,单个或成对排列, $0.44-0.66 \times 1.1-1.7$ 微米, 端生鞭毛单根, 运动(图2)。在肉汁平板上菌落圆形, 扁平, 表面粗糙, 边缘不整齐, 灰白色, 半透明, 中心有乳头状突起, 具金属光泽。斜面生长, 菌苔有金属光泽, 培养基由绿色转为暗绿色, 具荧光。囊状液化明胶, 氧化葡萄糖。42℃ 生长良好, 牛奶变碱, 胨化, 并使石蕊还原。

根据伯基(Bergey)手册第七版^[17], 按上述各种性状, 研究了两株菌在分类学上的位置, 认为均属于假单胞杆菌属(*Pseudomonas*)。AS 1.593 具有不液化明胶, 37℃ 生长良好, 以及牛奶变碱, 但无石蕊还原反应等特征, 鉴定为卵形假单胞杆菌(*P. ovalis*)。而 AS 1.860 液化明胶, 42℃ 生长良好, 牛奶变碱, 则鉴定为铜绿色假单胞杆菌(*P. aeruginosa*)。

四、AS 1.593 和 AS 1.860 两株菌在不同培养基中产水杨酸能力的比较和菌种的保存

比较了 AS 1.593 和 AS 1.860 两株菌在

本试验所列举的三种发酵培养基中的产酸情况, 试验结果表明(图3), AS 1.860 不论在那一种培养基内, 其产酸浓度均比 AS 1.593 高, 因而在以后的发酵条件试验中, 我们选用了 AS 1.860 这株菌作为试验用菌种。

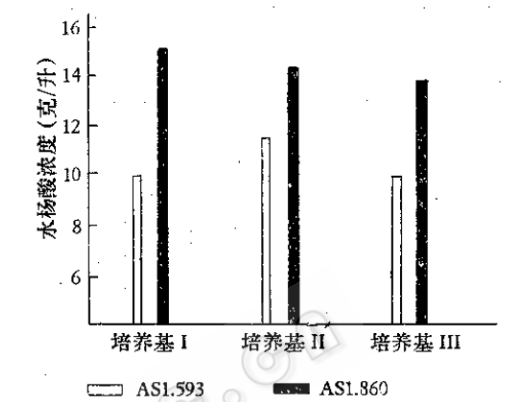


图3 AS 1.593与 AS 1.860 在不同培养基内的产酸量

这两株菌接种在蔡斜面上, 低温保存(不传代), 或室温保存在牛肉汁斜面上, 每二周传代一次。结果(表2)表明, 一年半后产酸情况基本稳定, 这对研究与生产都是极为有利的。

表2 保存后菌株产酸情况

菌 株	AS 1.593					AS 1.860				
	蔡 斜 面*				牛肉汁斜面**	蔡 斜 面				牛肉汁斜面
保存时间(月)	1	3	12	18	18	1	3	12	18	18
水杨酸(克/升)	12.3	13.1	12.8	14.0	13.2	16.4	15.6	15.6	16.0	15.0

* 生长在蔡斜面上低温保存, 不传代。
** 生长在肉汁斜面上, 室温保存, 每二周传代一次。

AS1.860 菌株产水杨酸的条件

一、接种量与种龄对产酸的影响

采用培养不同时间的种液接种发酵, 接种量分别为1%, 3%, 5%, 3天后测定, 发现生长24小时的种液, 接种量在1—5%

之间, 产酸量完全一致(表3)。图4表明, 24小时的种液, 活菌数最高, 种液的 pH 为 6.2。培养时间短, 活菌数较少, 因而必须加大接种量, 而种液培养时间过长, 特别是种液的 pH 下降到 5.8 以下, 活菌数急剧减少, 最后当 pH 降到 4.8 时, 所有细胞全部

死亡，看来种龄对水杨酸发酵是相当重要的。

表 3 接种量与种龄对产酸的影响

水杨酸 (克/升)	接种量 (%)	1	3	5
种龄 (小时)				
12		0.0	0.1	3.1
18		7.6	14.0	15.9
24		15.7	15.8	15.7
28		14.8	15.8	15.7
33		6.2	11.3	14.2
48		0.0	0.0	0.0

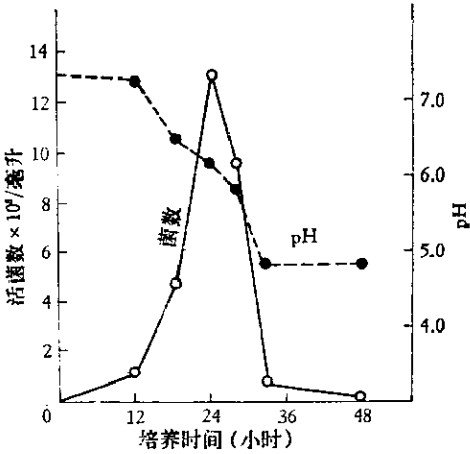


图 4 种液培养过程中菌的生长曲线

二、培养基起始 pH 值对产酸的影响

用 NaOH 和 HCl 溶液将发酵培养基调至不同 pH 后接种培养。测定结果表明，起始 pH 为 6.0 时，水杨酸浓度为每升 14.7 克，随着 pH 的增高，产酸量也逐渐提高。在起始 pH 为 8.2 时，培养 96 小时，酸的浓

度可达每升 19.4 克。另外不同时间取样分析发现，较高的起始 pH 可延缓发酵液 pH 的下降，使发酵液内累积的水杨酸量增加，而培养基的起始 pH 较低时，则发酵液的 pH 下降快，因而较早地抑制了菌氧化萘形成水杨酸的作用(表 4)。

表 4 发酵培养基的起始 pH 对产酸的影响

起始 pH	培养时间 (小时)	48		72		96	
	发酵情况	终止 pH	酸(克/升)	终止 pH	酸(克/升)	终止 pH	酸(克/升)
6.0		5.8	14.7	5.8	14.7	5.8	14.7
7.0		5.8	15.7	5.8	15.9	5.8	15.7
7.4		5.8	16.2	5.8	16.4	5.8	16.4
7.8		6.0	16.4	5.8	16.7	5.8	16.7
8.2		6.3	13.1	6.0	18.7	5.8	19.4

三、磷酸盐适宜浓度

图 5 例举了发酵培养基中磷酸盐对水杨酸形成的影响。从此可以看出，较高浓度的磷酸盐有利于酸的累积。当 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 的浓度为 3% 时，发酵 96 小时，酸的浓度达每升 19.4 克。

四、碳酸钙对产酸的影响

培养基内碳酸钙的添加量对酸的累积

有一定的影响，图 6 证明，碳酸钙的浓度在 3% 以内，随着浓度的增加，酸的产量也逐渐提高。在 3% 的碳酸钙浓度下，产量为 17 克/升。韦斯利^[6]认为水杨酸的钙盐对细菌有毒害作用，但在本试验中似乎并没有看到钙盐的抑制作用。

五、氮源对产酸的影响

氮素是细胞生长发育所必须的。为了

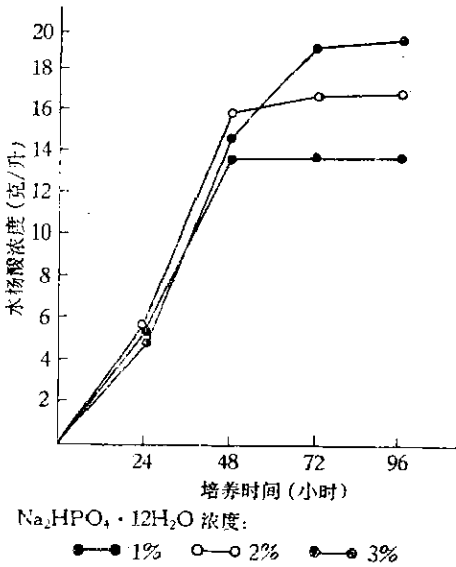
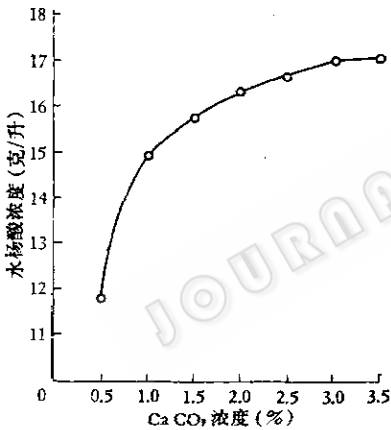
图5 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 浓度对产酸的影响

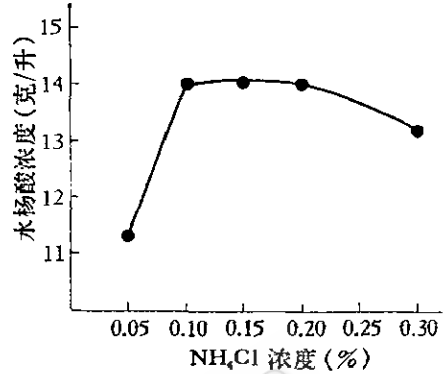
图6 碳酸钙对产酸的影响

寻得适宜的氮源种类和氮源量,对 NH_4Cl , NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 等几种生产上常用的氮源进行了试验。结果(表

表5 几种氮态氮对产酸的影响

氮 源	浓 度 (%)	终止 pH	水 杨 酸 (克/升)
NH_4Cl	0.15	6.2	14.0
NH_4NO_3	0.10	6.4	14.0
$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	0.05	6.4	13.2
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.20	6.4	13.3

5)指出,所试验的这几种氮源对 AS 1.860 菌产酸影响不大。 NH_4Cl 用量的试验证明,浓度在 0.1—0.2% 范围内产酸较高(图 7),过量对酸的累积也是不利的。

图7 NH_4Cl 浓度对产酸的影响

六、萘的浓度对产酸的影响

发酵液中萘浓度在 1% 和 2% 时,发现随着水杨酸的形成,萘量迅速下降,转化率分别为耗萘量的 100% 和 94%。当发酵液中萘的浓度减少到 0.5% 以下时,所形成的水杨酸就开始降解,细胞则再一次利用水杨酸进行生长,因而溶液的 pH 值略有回升。当投加 3% 萘时,整个发酵过程因萘量充足,没有细胞再次生长及水杨酸消失现象出现。发酵液颜色由无色到茶色至茶褐色,并逐渐转为褐色。水杨酸的累积在 20—50 小时最快,酸的累积量每小时约为 0.3—0.5 克/升。20 小时前,水杨酸的浓度是极其微量的,50 小时后水杨酸浓度缓慢增加,最后达每升 15 克以上。细胞生长和产酸变化曲线的趋势在 50 小时前基本相同,可见酸的累积与细胞生长有密切关系。随着水杨酸的大量形成, pH 值迅速下降,在 pH 值下降到 6 以下,整个发酵基本结束(图 8)。

七、铁盐对酸形成的影响

从图 9 可以看出,铁盐是形成水杨酸所必需的,但其用量很低,采用 $\text{FeSO}_4 \cdot$

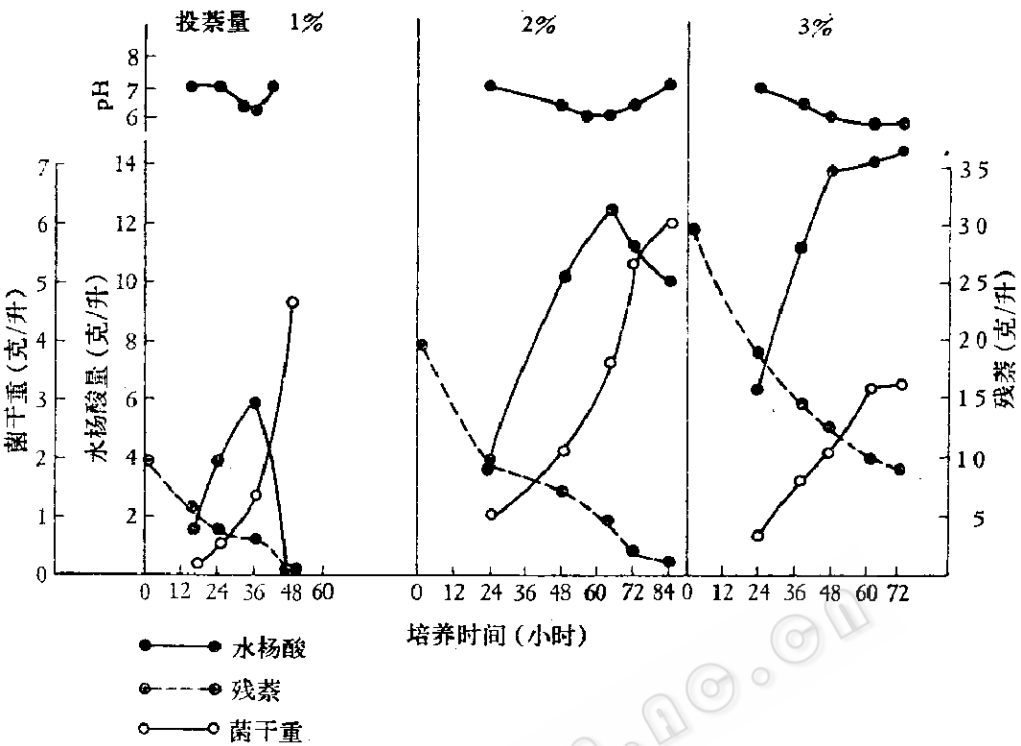


图 8 不同投萘量对水杨酸累积的影响

7H₂O 配制培养基，一般在 50ppm 左右为宜，超过此浓度则随着铁盐浓度的提高，水杨酸量明显下降。铁离子是否作为水杨酸氧化酶的辅基组份，参与了氧的活化作用还不清楚。

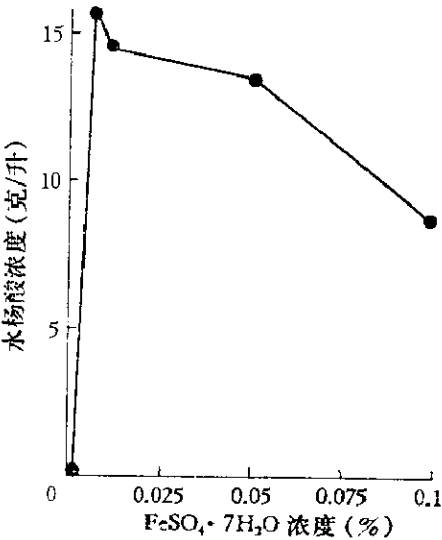


图 9 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 浓度对产水杨酸的影响

八、通气量对产酸的影响

在 500 毫升摇瓶内盛装不同量的培养基接种培养，并分别在 52 和 84 小时取样分析，图 10 指出，在较短的时间内，随着培养基体积的增加，产酸浓度逐渐下降，通气加速了水杨酸的生成，通气量小则延长培养时间，最后的产酸量却仍可达到同样水平。在 500 升罐上测定了不同空气流量对

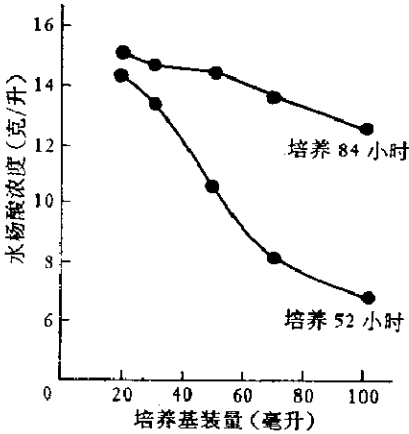


图 10 通气量对产酸的影响

产酸的影响(表 6), 发现不论流量大小都可获得同样的产酸浓度, 只是流量小时发酵时间延长。在 1:1 的流量下达到最高的酸浓度仅需 26 小时左右, 而在 1:0.05 的流量则需要 60 多小时才能达到同样的产酸量。这与摇瓶的结果是一致的, 都说明通气量影响水杨酸的形成速率, 而并不影响水杨酸的累积浓度。

表 6 空气流量对产酸的影响

空气流量 (体积:体积)	发酵时间 (小时)	水 杨 酸 (克/升)
1:0.05	68	12.5
	60	10.0
1:0.1	52	11.5
	48	12.4
1:0.3	52	12.4
1:0.5	40	12.4
1:1	28	12.7
	24	12.4

九、温度对产酸的影响

用 50 升发酵罐进行了温度对产酸的影响试验, 试验均在发酵 64 小时取样, 空

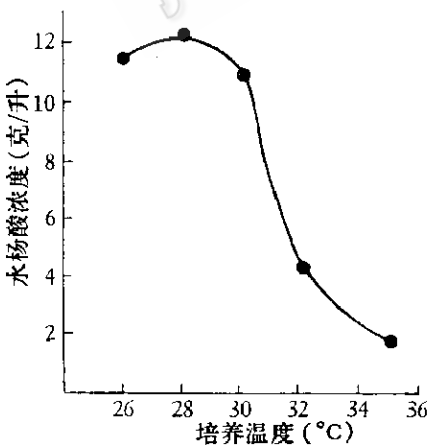


图 11 温度对产酸的影响

气流量为 1:1。从图 11 可以看出, 菌氧化萘形成酸的最适温度为 28℃。26℃ 和 30℃ 产酸稍低些, 30℃ 以上则酸量急剧下降。

参 考 资 料

- [1] Strawinski, R. J. and Stone, R. W.: *J. Bacteriol.*, 45:16, 1943.
- [2] Ishikura, T., Nishida, H., Tanno, K., Miyachi, N. and Ozaki, A.: *Agr. Biol. Chem.*, 32:12—20, 1968.
- [3] Strawinski, R. J. and Stone, R. W.: *Can. J. Microbiol.*, 1:206—210, 1954.
- [4] Klausmerier, R. E. and Strawinski, R. J.: *J. Bacteriol.*, 73:461—464, 1957.
- [5] Hosler, P.: *Biotechnol. Bioeng.*, 5:234—251, 1963.
- [6] Wessley, D. F.: Paper presented at 154th Annual Meeting of the A.C.S., September, 11, 1967.
- [7] Goren, M. B., Zajic, J. E. and Dunlap, W. J.: U. S. Patent, No. 3, 272,716, 1966.
- [8] Zajic, J. E. and Dunlap, W. J.: U. S. Patent, No. 3,274,074, 1966.
- [9] Rogoff, M. H.: U. S. Patent, No. 3,331,750, 1967.
- [10] Murphy, J. F. and Stone, R. W.: *Can. J. Microbiol.*, 1:579—588, 1955.
- [11] Fernley, H. N. and Evans, W. C.: *Nature*, 182:373—375, 1958.
- [12] Davies, J. I. and Evans, W. C.: *Biochem. J.*, 91:251—261, 1964.
- [13] Kitai, A. and Ozaki, A.: *J. Ferment. Technol.*, 47:527—535, 1969.
- [14] Abbott, B. J. and Gerhardt, P.: *Biotechnol. Bioeng.*, 12:577—589, 1970.
- [15] Gonzalez Valdes, A. and Casas-Campillo, C.: *Rev. Soc. Quim. Mex.*, 16:105—110, 1972.
- [16] Snell, F. D. and Snell, C. T.: *Colormetric Methods of Analysis*, Vol. III, p. 405, D. van. Nostrand Co., New York, 1953.
- [17] Breed, R. S.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 7th ed., p. 89—152, Bailliere., Tindall Cox, Ltd., London, 1957.

MICROBIAL PRODUCTION OF SALICYLIC ACID FROM NAPHTHALENE

FA YOU-HUA, XU SHI-WEI AND LIANG JIA-YUAN

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Peking*)

ZHONG HU-XING, WANG SHAO-FEN, TANG JIONG, ZHANG LI-TONG, LI HOU-XIN,

HUANG SHU-FANG, CUI FU-QUAN AND CHEN GUO-JUN

(*Peking Coke Chemical Works Coke Chemical Research Division*)

284 strains of naphthalene-utilizing bacteria were isolated from 172 samples by enriched culture in media containing naphthalene as a sole source of carbon. Most of these strains could produce salicylic acid from naphthalene and the acid production were determined colorimetrically.

Two strains, AS 1.593 and AS1.860, showed a better growth and had a stable yield of salicylic acid. They were identified to be *Pseudomonas ovalis* and *Pseudomonas aeruginosa* respectively according to Bergey's Manual. Both strains were maintained for eighteen months, and no degeneration of their acid

producing ability was detected.

The conditions for acid production of strain AS 1.860 were examined. It was found that the slightly basic initial pH and the higher concentration of dibasic sodium phosphate in the fermentation medium increased the salicylic acid accumulation. Ferric iron was essential for the salicylic acid production and no detectable influence of ammoniacal nitrogen source was observed. Aeration accelerated the production rate of salicylic acid but had no influence on its final concentration. Under optimal conditions more than 19g./l. of salicylic acid was produced by strain AS 1.860.