

Karakteristik Bakteri Endofit Akar Tanaman Kedelai Penghasil Hormon Tumbuh IAA

Afifah Mariana^{1*}, Agus Irianto ¹, Iman Budisantoso ¹

¹Program Studi Biologi, Fakultas Biologi, Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto, Indonesia

*Corresponding author: afifah.mariana@unsoed.ac.id

ABSTRACT

The increase in soybean production and productivity has become a significant focus in the effort to meet global food demands. The use of environmentally friendly agricultural technologies and practices is a vigorously pursued strategy. Endophytic bacteria are one of the potential bioagents that can stimulate plant growth. The ability of endophytic bacteria to synthesizing the plant hormone indole-3-acetic acid (IAA) can be an alternative in the effort to enhance soybean plant productivity and ensure long-term agricultural sustainability. The objective of this study is to analyze diversity and ability of endophytic bacteria isolated from soybean roots to produce IAA. This research was conducted through several stages, including the isolation of endophytic bacteria from soybean root, evaluating the isolates' ability for IAA production, and characterizing potential isolates based on macroscopic and microscopic characteristics. This research indicated that a total of 11 endophytic bacteria isolates were obtained from soybean plant roots. Among them, four isolates, namely EAK4, EAK5, EAK6, and EAK8, demonstrated the capability to synthesizing IAA ranging from 35.46 to 44.56 ppm. These isolates showed various macroscopic and microscopic characteristics and hold promise as biological agents that promote plant growth.

Keywords: *endophytic bacteria, IAA, plant growth promoting bacteria*

ABSTRAK

Peningkatan produksi dan produktivitas tanaman kedelai menjadi fokus penting dalam upaya pemenuhan kebutuhan pangan global. Penggunaan teknologi dan praktik pertanian yang ramah lingkungan merupakan strategi yang gencar dikembangkan. Bakteri endofit merupakan salah satu agen hayati yang berpotensi memicu pertumbuhan tanaman. Produksi hormon tumbuh indole-3-acetic acid (IAA) oleh bakteri endofit dapat menjadi alternatif dalam upaya peningkatan produktivitas tanaman kedelai guna menjaga keberlanjutan pertanian jangka panjang. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menganalisis keragaman dan kemampuan bakteri endofit asal akar tanaman kedelai dalam menghasilkan IAA. Penelitian ini dilakukan melalui serangkaian tahapan yaitu solasi bakteri endofit asal akar tanaman kedelai, pengukuran kemampuan isolat dalam menghasilkan IAA, dan karakterisasi isolat yang memiliki potensi dengan melihat karakter makroskopis dan mikroskopis. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sebanyak 11 isolat bakteri endofit berhasil diisolasi dari akar tanaman kedelai. Empat diantaranya yaitu isolat EAK4, EAK5, EAK6, dan EAK8 mampu menghasilkan IAA dengan konsentrasi antara 35,46-44,56 ppm. Isolat-isolat tersebut menunjukkan karakter makroskopis dan mikroskopis yang beragam dan berpotensi dikembangkan sebagai agen hayati pemicu pertumbuhan tanaman.

Kata Kunci: bakteri endofit, IAA, bakteri pemicu pertumbuhan tanaman

PENDAHULUAN

Bakteri endofit, yaitu bakteri yang mengkolonisasi jaringan tanaman tanpa menimbulkan penyakit, telah menarik perhatian dalam bidang pertanian (Tshikhudo et al., 2023). Salah satu aspek yang diperhatikan adalah kemampuan bakteri endofit dalam menghasilkan senyawa biokimia aktif seperti hormon tumbuh Indole-3-acetic acid (IAA) (Begum and Tamilselvi, 2016). Terdapat banyak jenis hormon auksin, salah satunya adalah IAA yang berperan penting dalam pertumbuhan dan perkembangan tanaman (Aryantha et al., 2004). Lebih lanjut Shokri and Emtiazi, (2010) menerangkan bahwa IAA dapat merangsang pemanjangan sel, meregulasi dominansi apikal, dan merangsang pembentukan akar lateral dan adventif.

Tanaman kedelai sebagai salah satu tanaman pangan utama di dunia memiliki nilai ekonomi yang tinggi (Wahyuni dan Noviani, 2019). Peningkatan produksi dan produktivitas tanaman kedelai menjadi fokus penting dalam upaya pemenuhan kebutuhan pangan global. Menurut Suminartika (2020), intensifikasi pertanian, yang merupakan upaya untuk meningkatkan produksi dan produktivitas melalui penggunaan teknologi dan praktik pertanian yang lebih efisien, merupakan strategi yang umum digunakan.

Bakteri endofit memiliki potensi untuk mendukung intensifikasi pertanian dengan cara menghasilkan hormon tumbuh,

efisiensi serapan nutrisi, dan toleransi terhadap stres lingkungan (Zaghloul et al., 2016). Penggunaan bakteri endofit yang mampu menghasilkan IAA sebagai sumber alami hormon tumbuh dapat menjadi alternatif dalam upaya peningkatan produktivitas tanaman kedelai guna menjaga keberlanjutan pertanian jangka panjang. Oleh karena itu, tujuan dari penelitian ini adalah untuk menganalisis keragaman dan kemampuan bakteri endofit asal akar tanaman kedelai dalam menghasilkan IAA.

METODE

Isolasi bakteri endofit akar tanaman kedelai

Akar tanaman kedelai varietas Grobogan diambil, ditimbang seberat 1 g. Potongan akar disterilkan dengan direndam dalam larutan NaOCl 1% selama 2 menit, lalu direndam dalam alkohol 70% selama 1 menit dan terakhir dibilas menggunakan akuades steril sebanyak 3 kali. Akar yang telah steril lalu ditumbuk menggunakan mortar dan alu. Sampel kemudian diencerkan menggunakan akuades steril secara bertingkat hingga 10^{-5} . Dari tabung pengenceran 10^{-4} dan 10^{-5} dilakukan penanaman sebanyak 0,1 ml suspensi sampel ke medium *Tryptic Soy Agar* (TSA) (Oxoid) dan dilakukan inkubasi selama 2x24 jam pada suhu ruang. Koloni bakteri yang menunjukkan karakter morfologi berbeda dimurnikan dengan teknik gores kuadran.

Pengukuran Kemampuan Isolat Bakteri Endofit Asal Akar Tanaman Kedelai dalam Menghasilkan IAA

Isolat bakteri ditumbuhkan pada medium yang disuplementasi dengan triptofan. Sebanyak 3 ml suspensi bakteri berkepadatan 10^8 sel/ml diinokulasikan pada 30 ml media *Nutrient Broth* + 100 ppm L-Triptofan. Kultur bakteri diinkubasi pada suhu ruang dan diagitasi menggunakan *shaker incubator* pada kecepatan 150 rpm selama 2x24 jam. Kadar IAA diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 530 nm. Filtrat dipisahkan dari biomassa sel menggunakan *centrifuge* pada kecepatan 5000 rpm selama 25 menit. Filtrat yang dihasilkan kemudian direaksikan dengan reagen Salkowski (perbandingan 1 : 2). Pengukuran absorbansi dilakukan setelah analit diinkubasi dalam suasana gelap pada suhu ruang selama 30 menit. Hasil plot linear nilai absorbansi IAA standar dijadikan acuan dalam penentuan konsentrasi IAA yang diproduksi oleh bakteri endofit.

Karakterisasi Isolat Bakteri Endofit Asal Akar Tanaman Kedelai

Isolat yang memiliki kemampuan menghasilkan IAA dikarakterisasi secara makroskopis dan mikroskopis. Isolat murni digores kuadran pada medium *Nutrient Agar* (NA) (Oxoid) dan diamati karakter makroskopisnya meliputi warna koloni, karakteristik optik, bentuk koloni, elevasi koloni, dan tepi koloni. Karakter mikroskopis dilakukan dengan mengamati bentuk sel, jenis Gram, uji katalase, dan uji oksidase.

Pewarnaan Gram

Isolat bakteri diambil sebanyak 1 ose dan diulaskan di atas *object glass* yang telah ditetesi akuades steril. Ulasan bakteri kemudian difiksasi di atas lampu spiritus sebanyak 2-3 kali. Reagen *crystal violet* sebagai pewarna dasar ditetaskan di atas ulasan isolat dan didiamkan selama 1 menit, *object glass* kemudian dicuci dengan akuades mengalir dan dikeringanginkan. Reagen *lugol's iodine* sebagai pewarna mordant ditetaskan di atas ulasan isolat dan didiamkan selama 1 menit, *object glass* kemudian dicuci dengan akuades mengalir dan dikeringanginkan. Reagen etanol 96% sebagai pemucat ditetaskan secara berulang di atas ulasan isolat hingga tetesan etanol terakhir yang jatuh berwarna jernih, *object glass* kemudian dicuci dengan akuades mengalir dan dikeringanginkan. Reagen safranin sebagai pewarna pembanding ditetaskan di atas ulasan isolat dan didiamkan selama 1 menit, *object glass* kemudian dicuci dengan akuades mengalir dan dikeringanginkan. Preparat kemudian diamati di mikroskop dengan perbesaran total 1000x.

Uji katalase

Sebanyak 1 ose isolat bakteri diulaskan di atas *object glass*. Reagen H_2O_2 kemudian ditetaskan di atas ulasan isolat bakteri. Interpretasi positif ditandai dengan terbentuknya gelembung gas di atas ulasan isolat.

Uji oksidase

Isolat bakteri diambil sebanyak 1 ose dan diulaskan pada kertas saring. Kertas saring ditetesi dengan 1-2 tetes reagen (tetramethyl-Dphenylenediaminedihydrochloride). Interpretasi positif ditandai dengan adanya perubahan warna menjadi biru marun pada ulasan bakteri.

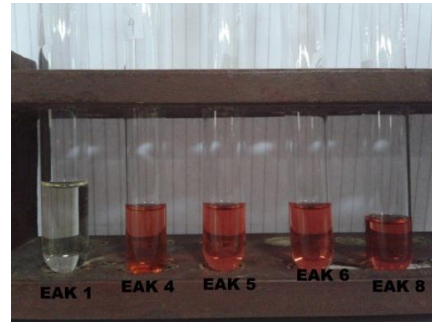
HASIL DAN PEMBAHASAN

Sebanyak 11 isolat bakteri endofit dengan karakter morfologi berbeda berhasil diisolasi dari akar tanaman kedelai. Isolat-isolat tersebut kemudian diberi kode EAK1-11. Seluruh isolat diuji kemampuannya dalam menghasilkan IAA. Hasil pengukuran produksi IAA menunjukkan bahwa terdapat 4 isolat yang mampu menghasilkan IAA yaitu isolat EAK4, EAK5, EAK6, dan EAK8. Hal ini ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah pada kultur bakteri setelah ditetesi reagen Salkowski (Gambar 1.)

Deteksi IAA dengan metode kolorimetri menggunakan reagen Salkowski pertama kali dikenalkan oleh Gordon dan Waber di tahun 1951. Reagen Salkowski terdiri dari 0,5 M besi klorida (FeCl_3) dan 35% asam perklorat (HClO_4). Reagen ini akan bereaksi dengan IAA yang dihasilkan oleh bakteri, membentuk kompleks senyawa berwarna merah (Gang *et al.*, 2019).

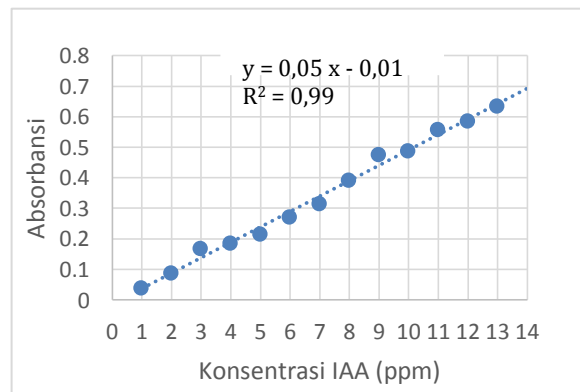
Lebih lanjut Sukmadewi *et al.* (2015) menerangkan bahwa IAA yang dihasilkan oleh bakteri akan bereaksi dengan Fe dan membentuk senyawa kompleks

$[\text{Fe}_2(\text{OH})_2(\text{IA})_4]$. Rahman *et al.* (2010) menambahkan, kompleks senyawa Fe(III)-IAA yang terbentuk akan membuat larutan tersebut tampak berwarna merah. Warna yang terbentuk akibat reaksi positif menunjukkan adanya berbagai senyawa indol seperti IAA atau analognya yang merupakan hasil metabolisme triptofan.



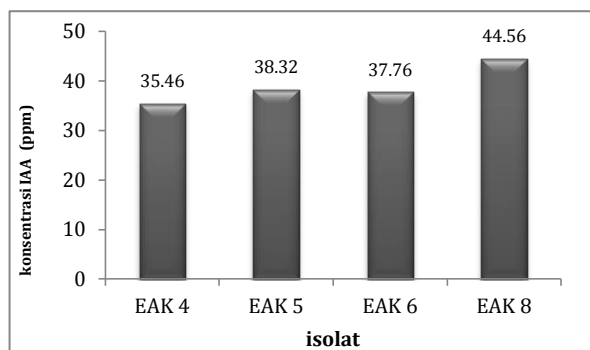
Gambar 1. Perubahan warna campuran filtrat dan reagen Salkowski

Kuantifikasi IAA hasil sintesis bakteri endofit mengacu pada plot linear absorbansi IAA standar (Gambar 2.).



Gambar 2. Kurva standar IAA

Gambar 3. menunjukkan besarnya ppm IAA hasil sintesis isolat bakteri endofit. Kadar IAA tertinggi secara berurutan ditunjukkan oleh EAK8, EAK5, EAK6, dan EAK4 yaitu sebesar 44,56 ppm; 38,32 ppm; 37,76 ppm; dan 35,46 ppm.



Gambar 3. Kandungan IAA hasil sintesis isolat bakteri endofit

IAA yang disintesis oleh isolat EAK4, EAK5, EAK6, dan EAK8 tergolong dalam konsentrasi tinggi bila dibandingkan dengan penelitian-penelitian yang telah dilaporkan sebelumnya. Iswanti *et al.*, (2018) mengisolasi bakteri endofit dari akar tanaman ubi jalar. Pengukuran konsentrasi IAA yang dilakukan pada isolat tersebut menunjukkan hasil berkisar antara 0,16-2,08 ppm. Hasil penelitian yang dilakukan Khaeruni *et al.* (2020) menunjukkan bahwa isolat bakteri endofit asal tanaman kakao mampu menghasilkan IAA dengan konsentrasi 0,19-0,79 ppm.

Perbedaan kemampuan bakteri dalam menghasilkan IAA dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya kondisi lingkungan, laju pertumbuhan, ketersediaan asam amino dan

sumber nitrogen lainnya (Yarnaliza *et al.*, 2010).

Pembentukan IAA oleh mikroba juga bergantung pada jalur metabolisme triptofan, dimana triptofan bertindak sebagai prekursor utama dalam proses biosintesis IAA. Selain itu, pada beberapa mikroba endofit biosintesis IAA juga dirangsang oleh kolonisasi yang terjadi antara endofit dan jaringan tanaman (Shi *et al.*, 2009).

IAA yang disintesis bakteri berperan penting dalam interaksi antara mikroba dan tanaman. Konsentrasi IAA yang optimal dapat memodulasi pertumbuhan tanaman (Herlina *et al.*, 2017). Oleh karenanya, isolat bakteri endofit yang mampu menghasilkan IAA menjadi salah satu faktor yang menyebabkannya berperan dalam peningkatan pertumbuhan tanaman (Fitri *et al.*, 2020).

Karakterisasi makroskopis dan mikroskopis dilakukan pada isolat bakteri yang memiliki kemampuan menghasilkan IAA.

Tabel 1. Karakter makroskopis dan mikroskopis isolat bakteri endofit penghasil IAA

Kode Isolat	Morfologi Koloni					Morfologi Sel		Oksidase	Katalase
	warna	karakter optik	bentuk	elevasi	tepi	bentuk	Gram		
EAK4	kuning	opaque	circular	raised	entire	bacil	+	-	-
EAK5	krem	transparan	circular	flat	entire	bacil	+	-	+
EAK6	putih	transparan	circular	flat	entire	coccus	-	+	+
EAK8	kuning	opaque	circular	raised	entire	bacil	+	-	+

Sousa *et al.* (2013) menerangkan bahwa morfologi koloni dapat menjadi indikator pada keragaman fenotipik yang merupakan proses adaptif guna mengatasi

cekaman lingkungan. Waktu pertumbuhan dan komposisi medium merupakan variabel yang memberikan dampak paling tinggi terhadap diferensiasi koloni suatu mikroorganisme. Morfotipe koloni mikroba terbukti menjadi metode yang andal dalam pengevaluasian peralihan fenotipik dan penyimpulan keragaman bakteri dalam suatu sampel.

Salah satu karakter yang diamati dalam pengamatan morfologi koloni adalah warna. Isolat bakteri endofit asal akar tanaman kedelai penghasil IAA menunjukkan warna koloni yang beragam. Menurut Usman *et al.* (2017), variasi warna koloni bakteri disebabkan oleh pigmen yang dihasilkan oleh bakteri tersebut. Pigmen yang mempengaruhi warna koloni bakteri diantaranya karotenoid, melanin, violacein, prodigiosin, pyocyanin, actinorhodin, dan zeaxanthin. Selain itu, Fitri *et al.* (2020) menambahkan bahwa beberapa faktor eksternal juga turut berpengaruh terhadap variasi warna koloni. Faktor eksternal yang dimaksud diantaranya adalah medium, pH, dan temperatur.

Tiga dari 4 isolat bakteri endofit akar tanaman kedelai penghasil IAA tergolong dalam bakteri Gram positif berbentuk batang, sementara 1 lainnya tergolong dalam bakteri Gram negatif berbentuk bulat.

Pewarnaan Gram merupakan tahapan eksaminasi penting dalam identifikasi bakteri karena beberapa sifat sel dapat dikorelasikan dengan sifat dinding sel yang merupakan dasar dari pewarnaan ini. Ketebalan dinding sel bakteri Gram positif berkisar antara 20–

80nm, sementara lapisan dinding sel Gram negatif tergolong relatif tipis dengan ketebalan kurang dari 10nm. Bakteri Gram negatif memiliki lapisan membran tambahan yang memiliki beberapa pori. Perbedaan struktur dinding sel ini memberikan sifat yang berbeda pada sel, khususnya respon terhadap tekanan eksternal seperti panas, radiasi UV, dan antibiotik (Mai-Prochnow *et al.*, 2016).

Uji oksidase yang dilakukan terhadap isolat bakteri endofit asal akar tanaman kedelai penghasil IAA menunjukkan hasil positif untuk 1 isolat yang ditandai dengan terbentuknya warna biru marun pada ulasan isolat bakteri sedangkan 3 isolat lainnya menunjukkan hasil negatif yang ditandai dengan tidak terbentuknya warna biru marun pada ulasan isolat bakteri.

Uji oksidase digunakan untuk mendeteksi keberadaan enzim sitokrom oksidase atau indofenol oksidase. Enzim ini mengkatalisis oksidasi sitokrom C yang berperan dalam transport elektron ke akseptor terakhir berupa oksigen (Dharmappa *et al.*, 2022).

Hasil uji katalase menunjukkan bahwa 3 isolat terinterpretasi positif sementara 1 lainnya menunjukkan hasil negatif. Metabolisme mikroorganisme aerob dan fakultatif anaerob menghasilkan produk sampingan yang beracun seperti hidrogen peroksida. Enzim katalase akan membantu menguraikan hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen. Reaksi ini dapat dibuktikan

dengan terbentuknya gelembung gas yang merupakan interpretasi hasil positif dari pengujian ini (Khatoon *et al.*, 2022).

Isolat bakteri endofit penghasil IAA pada penelitian ini membuktikan bahwa bakteri endofit merupakan agen hayati potensial pemacu pertumbuhan tanaman. Pentingnya peranan bakteri endofit tersebut dapat dijadikan peluang untuk pengembangan isolat sebagai pupuk hayati dalam upaya peningkatan produktivitas tanaman kedelai. Penelitian lanjutan perlu dilakukan untuk mengetahui optimasi produksi IAA dan identitas dari tiap isolat.

KESIMPULAN

Sebanyak 11 isolat bakteri endofit berhasil diisolasi dari akar tanaman kedelai. Dari 11 isolat tersebut, 4 isolat menunjukkan kemampuan menghasilkan hormon tumbuh IAA. Berdasarkan karakteristik makroskopis dan mikroskopis, isolat bakteri endofit asal akar tanaman kedelai penghasil IAA menunjukkan karakter yang berbeda-beda. Isolat-isolat tersebut berpotensi menjadi kandidat agen hayati pemicu pertumbuhan tanaman.

DAFTAR PUSTAKA

Aryantha, I.N., D.P. Lestari., N.P.D. Pangesti. 2004. Potensi Isolat Bakteri Penghasil IAA dalam Peningkatan Pertumbuhan Kecambah Kacang tanah Pada Kondisi Hidroponik. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia*. 9 (2) : 43 -46.

Begum, S.R., and K.S. Tamilselvi. 2016. Endophytes are Plant Helpers: An Overview. *International Journal of*

Current Microbiology and Applied Sciences. 5(4): 424-436.

- Dharmappa, D.C., Anokhe, A., and Kalia, V. 2022. Oxidase Test: A Biochemical Methods in Bacterial Identification. *AgriCos e-Newsletter*. 3(1):31-33.
- Fitri, L., Ismail, Y.S., Putriani, and Warzatullisna. 2020. Application of Rice Root Endophytic Bacteria in Ciherang Variety Rice (*Oryza sativa*) Seeds. *Biosaintifika*. 12(1): 21-27.
- Gang, S., Sharma, S., Saraf, M., Buck, M., and Schumacher, J. 2019. Analysis of Indole-3-acetic Acid (IAA) Production in *Klebsiella* by LC-MS/MS and the Salkowski Method. *Bio Protocol*. 9(9) doi: [10.21769/BioProtoc.3230](https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3230)
- Herlina, L., Pukan, K.K., and Mustikaningtyas, D. 2017. The endophytic bacteria producing IAA (Indole Acetic Acid) in *Arachis hypogaea*. *Cell Biology & Development*. 1(1):31-35.
- Iswanti, A., Asri, M.T., dan Lisdiana, L. 2018. Potensi Isolat Bakteri Endofit Dari Akar Tanaman Ubi Jalar Sebagai Penghasil Hormon Indole Acetic Acid. *Lentera Bio*. 7(2):110-114.
- Khaeruni, A., Nirmala, T., Hisein, W.S.A., Gusnawaty, Wijayanto, T., dan Sutariati, G.A.K. 2020. Potensi dan Karakterisasi Fisiologis Bakteri Endofit Asal Tanaman Kakao Sehat sebagai Pemacu Pertumbuhan Benih Kakao. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*. 25(3): 388–395.
- Khatoon, H., Anokhe, A., and Kalia, V. 2022. Catalase Test: A Biochemical Protocol for Bacterial Identification. *AgriCos e-Newsletter*. 3(1):53-55.
- Mai-Prochnow, A., Clauson, M., Hong, J., and Murphy, A.B. 2016. Gram positive and Gram negative bacteria differ in their sensitivity to cold plasma. *Nature Scientific Reports*. DOI: [10.1038/srep38610](https://doi.org/10.1038/srep38610)

- Rahman, A., Sitepu, I.R., Tang, S.Y., and Hashidoko, Y. 2010. Salkowski's Reagent Test as a Primary Screening Index for Functionalities of Rhizobacteria Isolated from Wild Dipterocarp Saplings Growing Naturally on Medium-Strongly Acidic Tropical Peat Soil. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 74(11):2202–2208.
- Shi, Y., Lou, K., and Li, C. 2009. Isolation, quantity distribution and characterization of endophyt microorganisms within sugar beet. *Afr J Biotechnol*. 8: 835-840
- Shokri, D. and G. Emtiazi. 2010. Indole-3-Acetic Acid (IAA) Production in Symbiotic and Non-Symbiotic Nitrogen-Fixing Bacteria and its Optimization by Taguchi Design. *Current Microbiology*. 61 : 217-225
- Sousa, A.M., Machado, I., Nicolau, A., and Pereira, M.O. 2013. Improvements on colony morphology identification towards bacterial profiling. *Journal of Microbiological Methods*. 95:327-335.
- Sukmadewi, D.K.T., Suharjono, and Antonius, S. 2015. Uji Potensi Bakteri Penghasil Hormon IAA (Indole Acetic Acid) dari Tanah Rhizosfer Cengkeh (*Syzigium aromaticum* L.). *Jurnal Biotropika*. 3(2):91-94.
- Suminartika, E. 2020. Penggunaan Input yang Optimal pada Usaha Tani Kedelai (Suatu Kasus di Desa Sukahurip, Kecamatan Pangatikan, Kabupaten Garut, Jawa Barat). *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*. 25 (4): 556–563.
- Tshikhudo, P.P., K. Ntushelo, and F.N. Mudau. 2023. Sustainable Applications of Endophytic Bacteria and Their Physiological/Biochemical Roles on Medicinal and Herbal Plants: Review. *Microorganisms*. 11(453): 1-43.
- Usman, H.M., Abdulkadir, N., Gani, M., and Maiturare, H.M. 2017. Bacterial Pigments and its Significance. *Medcrave*. 4(3):1-5.
- Wahyuni, S. dan Noviani, N. 2019, Isolasi Jamur Endofit Akar Kedelai dan Uji Penghambatannya Terhadap *Fusarium oxysporum* Sebagai Agen Pengendali Hayati. *BioLink*. 5(2):88-96.
- Yarnaliza, Siregar, M.W., Priyanti, N. 2010. Peran bakteri endofit penghasil IAA terseleksi terhadap pertumbuhan tanaman padi. *Prosiding Seminar Nasional Biologi FMIPA USU*, 219-228.
- Zaghloul, R.A., Abou-Aly, H.E., Tewfike, T.A., and Ashry, N.M. 2016. Isolation and Characterization of Endophytic Bacteria Isolated from Legumes and Non-Legumes Plants in Egypt. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 10(1): 277-290.