

PENINGKATAN GALUR PADA BAKTERI PENGHASIL IAA YANG DIISOLASI DARI BINTIL AKAR TANAMAN TURI

(Strain Improvement on IAA-Producing Bacteria Isolated from Root Nodules of *Sesbania grandiflora* (L))

Tiwit Widowati, Rahayu Fitriani Wangsa Putrie, Sylvia J. R. Lekatompessy dan Harmastini Sukiman

Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI Jl. Raya Bogor KM 46, Cibinong, Bogor, Indonesia
e-mail: tiwitwidowati@yahoo.com

Naskah diterima 11 April 2018, revisi akhir 31 Mei 2018 dan disetujui untuk diterbitkan 4 Juni 2018

ABSTRAK. Produksi hormon Indole Acetic Acid (IAA) dari bakteri dapat ditingkatkan melalui peningkatan kualitas galur. Peningkatan galur dapat dilakukan dengan mutasi kimia dan fisik. Tujuan penelitian ini adalah untuk meningkatkan produksi IAA bakteri yang diisolasi dari bintil akar tanaman turi melalui mutasi asam nitrat dan sinar UV. Bintil berwarna merah muda, sehat dan segar telah diisolasi dari akar tanaman Turi (*Sesbania grandiflora* (L)). Sebanyak 15 isolat bakteri telah diperoleh dan diuji kemampuannya dalam menghasilkan hormon IAA. Hasil analisis kolorimetri menunjukkan bahwa isolat TC 4.3.1.2 menghasilkan IAA tertinggi (17,72 µg/ml) dalam kultur yang ditambah L-triptofan. Berdasarkan analisis gen 16S rRNA, isolat TC 4.3.1.2 teridentifikasi sebagai *Rhizobium* sp. BGC8. Isolat penghasil IAA tertinggi diuji dengan perlakuan mutasi. Mutan asam nitrat menghasilkan hormon IAA (20,31-24,48 µg/ml) lebih tinggi dibandingkan mutan UV (0,61-19,55 µg/ml).

Kata kunci: bakteri, IAA, mutasi, peningkatan galur

ABSTRACT. Production of the Indole Acetic Acid (IAA) hormone from bacteria can be increased by improving the quality of the strain. Increased strains can be done with chemical and physical mutations. The study aimed to increase the production of bacterial IAA isolated from turi plant root nodule through mutation of nitric acid and UV rays. The fresh, healthy and pink colored nodule have been isolated from Turi plant (*Sesbania grandiflora* (L)) root which obtained 15 bacterial isolates then tested their ability to produce IAA hormone. The results of colorimetric analysis showed that TC 4.3.1.2 had highest IAA (17.72 µg/ml) in cultures plus L-triptofan. Based on 16S rRNA gene analysis, TC 4.3.1.2 isolate was identified as *Rhizobium* sp BGC8. The TC 4.3.1.2 isolates were tested by mutation treatment. The nitric acid mutant produced IAA hormones (20.31-24.48 µg ml) were higher than UV mutants (0.61-19.55 µg/ml).

Keywords: bacteria, IAA, mutation, strain improvement

1. PENDAHULUAN

Senyawa Indole Acetic Acid (IAA) merupakan salah satu fitohormon dengan aktivitas auksin yang mengatur proses perkembangan sel tumbuhan serta berkontribusi terhadap pertumbuhan xilem dan floem (Bharwadj *et al.*, 2014). IAA adalah produk umum dari metabolisme L-triptofan yang dihasilkan oleh beberapa mikroba. IAA yang dihasilkan oleh bakteri di sekitar perakaran bertindak sebagai

molekul pembawa sinyal komunikasi antara tumbuhan dan mikroba serta menunjang pertumbuhan tanaman. IAA membantu menghasilkan akar menjadi lebih panjang dengan cara meningkatkan jumlah rambut akar dan akar lateral yang terlibat dalam pengambilan nutrisi (Mohite, 2013).

Mikroorganisme biasanya menghasilkan metabolit penting dengan konsentrasi sangat rendah. Meskipun

hasilnya dapat ditingkatkan dengan cara mengoptimalkan kondisi kulturnya, namun produktivitasnya dikendalikan oleh genom organisme tersebut (Suribabu *et al.*, 2014). Proses peningkatan kemampuan biosintesis mikroba untuk mendapatkan produk yang diinginkan dalam jumlah yang lebih besar didefinisikan sebagai peningkatan galur mikroba (Saxena, 2015). Peningkatan galur dapat dilakukan melalui mutasi, seleksi atau rekayasa genetik. Peningkatan galur secara mutasi dapat diperoleh dengan cara memberi berbagai perlakuan fisik atau kimia. Sebagian besar mutagen menyebabkan beberapa kerusakan pada DNA, penghilangan, penambahan, pengalihan atau pergantian basa DNA (Parekh *et al.*, 2000).

Mutagen fisik dan kimia sering digunakan untuk meningkatkan hasil suatu galur. Sinar ultraviolet (UV) memberikan efek mutageniknya dengan cara menarik elektron dalam molekul. Penarikan elektron dalam molekul DNA sering menghasilkan pembentukan ikatan ekstra antara pirimidin yang berdekatan dengan DNA (Suribabu *et al.*, 2014). Pirimidin dimer sering mengubah bentuk DNA dalam sel dan menyebabkan masalah selama replikasi, bahkan perbaikan mekanismenya juga dapat menyebabkan mutasi. Mutagenesis yang diinduksi dengan menggunakan sinar UV diketahui efektif untuk menyeleksi mikroorganisme dalam menghasilkan zat aktif secara biologis dan peningkatan aktivitasnya (Goodarzi, 2016). Radiasi UV juga digunakan untuk meningkatkan kemampuan *Streptomyces griseoaurantiacus* dalam menghasilkan *endoglucanase* dan β -*glucosidase* (Kumar, 2015).

Mutagen kimia merupakan agen mutagenik yang dapat menyebabkan perubahan susunan DNA secara permanen. Asam nitrat dapat menyebabkan terjadinya ikatan silang DNA dalam untai yang sama. Asam nitrat bertindak sebagai mutagen dengan cara deaminasi NH_2 dari kelompok adenin dan sitosin ke kelompok eter sehingga merubah pasangan basanya. Hal ini menyebabkan deaminasi oksidatif basa tertentu. Konversi gugus amino ke

gugus keto akan merubah potensial ikatan hidrogen suatu basa (Suribabu *et al.*, 2014). Asam nitrat dilaporkan sebagai mutagen yang sesuai untuk meningkatkan produksi asam laktat *Lactobacillus delbrueckii* (John & Nampoothiri, 2008). Tujuan penelitian ini adalah untuk meningkatkan produksi IAA bakteri yang diisolasi dari bintil akar tanaman Turi melalui mutasi asam nitrat dan sinar UV.

2. METODE PENELITIAN

Isolasi dan Seleksi Bakteri Penghasil Hormon IAA

Bintil diambil dari perakaran tanaman Turi di daerah Cileungsi, Jawa Barat. Bintil akar dicuci dengan air mengalir kemudian direndam dalam etanol 95% selama 5-10 detik dan dicuci lagi dengan air steril 10 kali. Bintil akar diberi air steril 1 ml kemudian dihancurkan dengan batang kaca steril. Satu ose inokulum digoreskan pada cawan petri berisi media *Yeast Extract Mannitol Agar* (YEMA) yang sudah dicampur dengan *congo red* kemudian diinkubasi pada 28°C selama 3 hari.

Isolat bakteri selanjutnya diseleksi untuk produksi hormon IAA menggunakan metode penelitian Dey *et al.*, (2004). Isolat bakteri ditumbuhkan dalam 10 ml media *Nutrient Broth* (NB) yang mengandung 0,5 mM L-triptofan. Kultur diinkubasi pada suhu 28°C menggunakan *shaker* dengan kecepatan 150 rpm selama 24 jam kemudian dipanen melalui sentrifugasi pada 10.000 rpm selama 10 menit. Selanjutnya, sebanyak 2 ml supernatan dicampur dengan 2 ml reagen *Salkowsky* dan diinkubasi selama 60 menit di ruang gelap kemudian dibaca kepadatannya pada panjang gelombang 530 nm. Munculnya warna merah muda mengindikasikan adanya produksi IAA. Nilai IAA yang dihasilkan, dihitung berdasarkan standar IAA.

Identifikasi Molekuler

Satu koloni isolat diambil menggunakan tusuk gigi steril dan dimasukkan ke dalam tabung *eppendorf* yang berisi 100 ml dH_2O kemudian

divorteks. Suspensi 1 ml digunakan untuk amplifikasi dengan metode *polymerase chain reaction* (PCR). PCR (TC 5000 TECHNE) menggunakan universal primer 520 F (5'-GTGCCAGCAGCCGCGG-3') dan 920 R (5'-GTCAATTCCTTTGAGTTT-3'). Volume total PCR sebanyak 50 µl yang terdiri dari 1 µl DNA template dimana 2 µl primer masing-masing *forward* and *reverse*, 25 µl 2 kali KAPA Taq Ready Mix (KAPA Biosystem) dan ddH₂O 20 µl. Amplifikasi dilakukan selama 30 siklus yang meliputi tahap denaturasi awal pada suhu 96°C selama 5 menit, denaturasi pada suhu 96°C selama 30 detik, penempelan pada suhu 55°C selama 30 detik, pemanjangan pada suhu 72°C selama 1 menit dan pemanjangan akhir pada suhu 72°C selama 7 menit. Hasil PCR selanjutnya dielektroforesis selama 30 menit dengan voltase 100 V 500 cmA (BIO-RAD Mupid-exU-75577 Advance Japan). *Amplicon* DNA kemudian dimurnikan dan diseku dengan dua sistem. Analisis sekuen dilakukan dengan membandingkan sekuen dengan data dari *GenBank* menggunakan *Blastn* pada *National Center for Biotechnology Information* untuk menentukan kemiripan sekuen. Sekuen gen 16S rRNA juga dianalisis kekerabatannya dalam pohon filogenetik menggunakan perangkat lunak *Mega5* and *ClustalW*.

Perlakuan Sinar UV

Isolat penghasil IAA tertinggi selanjutnya diberi perlakuan mutasi. Galur induk ditumbuhkan dalam media *nutrient broth* (NB) (8 g/l). Suspensi sebanyak 4 ml dituang secara aseptik ke dalam cawan petri. Perlakuan sinar UV dilakukan di dalam *laminar air flow*. Jarak lampu UV dengan cawan petri sekitar 60 cm, dengan penyinaran selama 10, 20 dan 30 menit. Selama penyinaran, tutup cawan petri dibuka dan semua sumber cahaya dimatikan. Selanjutnya suspensi dipindahkan ke dalam tabung steril yang ditutup dengan kertas hitam dan disimpan di kulkas selama 24 jam untuk menghindari fotoreaksi. Suspensi setiap perlakuan diencerkan secara berseri dengan air steril, kemudian ditumbuhkan

pada media *nutrient agar* (NA) (23 g/l) dan diinkubasi pada suhu 28°C selama 24 jam. Jumlah koloni di setiap cawan dihitung menurut Kamala Kumari *et al.*, (2015). Mutan yang diperoleh kemudian diuji kembali untuk produksi IAA dan dibandingkan dengan galur induknya.

Perlakuan Asam Nitrat

Mutasi asam nitrat dilakukan menurut metode Kamala Kumari *et al.* (2015). Suspensi galur induk disiapkan dengan menggunakan larutan *buffer* asetat pH 7,5. Selanjutnya sebanyak 1 ml suspensi disentrifugasi kemudian peletnya diberi perlakuan asam nitrat (0,1 M natrium nitrit dalam *buffer* fosfat) dan diinkubasi pada 30°C selama durasi waktu 0, 30, 60, 90 dan 120 menit. Setelah diinkubasi, suspensi disentrifugasi pada 10.000 rpm. Pelet dicuci sebanyak dua kali dengan *buffer* fosfat pH 7 dan disimpan dalam *buffer* fosfat. Sampel kemudian diencerkan dan ditumbuhkan pada media NA dan diinkubasi pada 28°C selama 24 jam. Selanjutnya koloni yang tumbuh dihitung. Mutan yang diperoleh kemudian diuji untuk produksi IAA.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Sebanyak 15 isolat bakteri telah diperoleh dari hasil isolasi bintil akar tanaman Turi. Selanjutnya seluruh isolat diuji kemampuannya dalam menghasilkan hormon IAA. Terdapat 13 isolat yang mampu menghasilkan IAA dalam media cair yang ditambah dengan triptofan. Hasil isolasi dan uji IAA tersebut lebih rendah jika dibandingkan dengan hasil dari Sridevi & Mallailah (2007) yang memperoleh 26 isolat bakteri dari bintil akar tanaman Turi dan semuanya mampu memproduksi IAA. Konsentrasi IAA yang dihasilkan setiap isolat bervariasi antara 0,18-17,72 µg/ml. Isolat TC 4.3.1.2 menghasilkan IAA tertinggi sebesar 17,72 µg/ml, sedangkan isolat TC 3.7.2 dan TC 2.2.2.1 tidak dapat menghasilkan IAA (Tabel 1).

Tabel 1. Produksi IAA asal bakteri yang diisolasi dari bintil akar tanaman Turi

Kode Isolat	Produksi IAA (µg/ml)
TC 4.3.1.2	17,72
TC 1.2.3.1	0,73
TC 1.9.2.2	0,72
TC 2.4.1.1	0,66
TC 2.4.1.2	0,90
TC 1.1.1.2	1,13
TC 1.2.1.2	0,65
TC 1.1.1.1	1,41
TC 3.7.1.2	0,63
TC 3.7.1.1	0,45
TC 3.7.2	-0,75
TC 2.2.2.1	-9,12
TC 3.1.1	0,18
TC 2.3.3	0,88
TC 1.9.2.1	2,58

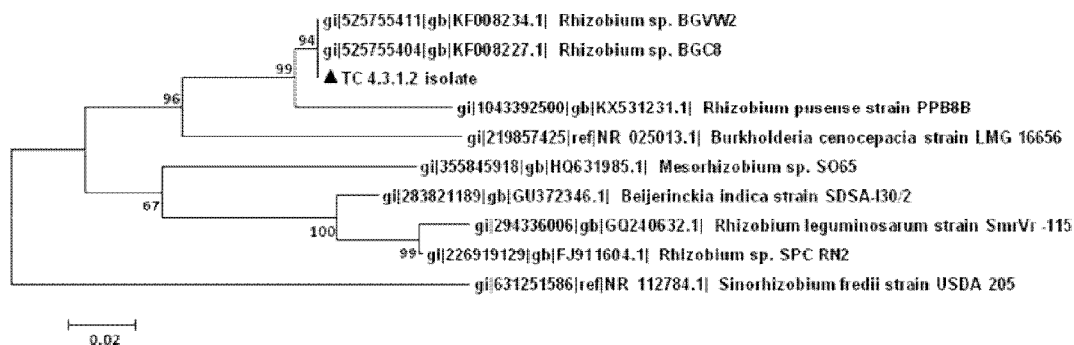
Beberapa bakteri yang diisolasi dari rizosfer mempunyai kemampuan untuk mensintesis IAA secara *in vitro* dengan atau tanpa adanya prekursor terutama triptofan. Isolat mikroba dari rizosfer mempunyai potensi yang besar untuk mensintesis dan menghasilkan IAA sebagai metabolit sekunder karena banyaknya asupan nutrisi. Konsentrasi IAA yang dihasilkan oleh setiap isolat berbeda, tergantung pada spesies dan galur selain juga dipengaruhi oleh kondisi kultur, fase pertumbuhan dan ketersediaan substrat (Spaepen *et al.*, 2007).

Urutan gen isolat TC 4.3.1.2 telah dianalisis dan dibandingkan dengan urutan gen 16S rRNA di *Genbank* dengan nomor aksesori KF008227 menggunakan program *BlastN*. Berdasarkan pohon filogenetik (Gambar 1), isolat TC 4.3.1.2

teridentifikasi sebagai *Rhizobium* sp BGC8 dengan kemiripan (94%).

Rhizobium merupakan bakteri fiksasi nitrogen yang bersimbiosis dengan tanaman polong. Hormon IAA yang dihasilkan oleh galur *Rhizobium* mampu menunjang pertumbuhan tanaman serta membantu pembentukan dan perkembangan bintil akar. Hormon IAA yang dihasilkan *Rhizobium* sp. TC 4.3.1.2 lebih tinggi dibandingkan *Rhizobium* sp. 13 (28 µg/ml) yang juga diisolasi dari *S. grandiflora* (Sridevi & Mallailah, 2007).

Penelitian lain menyebutkan bahwa *Rhizobium* juga mempunyai potensi sebagai bakteri pemacu pertumbuhan tanaman (*plant growth promoting rhizobacteria*/PGPR) di samping menghasilkan IAA. Pemacu pertumbuhan tanaman oleh *rhizobia* dapat terjadi secara langsung (fiksasi nitrogen, pelarut fosfat, pembentukan siderofor dan produksi fitohormon seperti IAA, sitokinin, giberelin, asam absisat dan ACC deaminase). Cara tidak langsung yaitu *rhizobia* bertindak sebagai pemacu pertumbuhan tanaman dengan sifat biokontrol dan induksi ketahanan sistemik terhadap fitopatogen dan serangan hama. *Rhizobia* diketahui dapat mengendalikan jamur patogen pada akar tanaman yang disebabkan oleh genus *Fusarium*, *Rhizotocnia*, *Sclerotium* dan *Macrophomina*. Aktivitas antagonis *Rhizobia* terutama dikaitkan dengan produksi antibiotik, enzim mycolytic, asam hidrosianik (HCN) dan siderofor. *Rhizobia* juga dilaporkan menginduksi resistensi sistemik dan meningkatkan ekspresi gen



Gambar 1. Pohon filogenetik berdasarkan urutan gen 16S rRNA dari isolat TC 4.3.1.2

yang berhubungan dengan pertahanan tanaman melawan patogen (Das *et al.*, 2017). *Rhizobia* mempunyai beberapa mekanisme terhadap faktor cekaman seperti cekaman abiotik, logam berat dan pestisida (Gopalakrishnan *et al.*, 2015).

Mutasi fisik menggunakan sinar UV menyebabkan penurunan jumlah koloni mutan setelah waktu penyinaran 10-30 menit (Tabel 2). Mutan UV setelah waktu penyinaran 20 menit, menghasilkan hormon IAA (19,55 µg/ml) sedikit lebih tinggi dibandingkan galur induk (17,72 µg/ml). Produksi IAA menurun tajam setelah perlakuan UV selama 10 dan 30 menit. Penurunan produksi IAA setelah penyinaran UV selama 30 menit terjadi karena mutan yang dihasilkan tidak stabil atau mutan mengalami mutasi kembali ketika terpapar sinar UV (Raju & Divakar, 2013).

Tabel 2. Pengaruh sinar UV terhadap jumlah koloni dan produksi IAA

Waktu penyinaran (menit)	Jumlah koloni (per ml)	Produksi IAA (µg/ml)
10	1 x 10 ⁷	0,61
20	3 x 10 ⁶	19,55
30	1 x 10 ⁷	1,27

Radiasi ultraviolet (UV) merupakan salah satu cara termudah untuk menginduksi mutasi pada bakteri. Radiasi UV juga digunakan untuk meningkatkan produksi etanol, induksi toleransi alkohol pada khamir, peningkatan produksi asam *clavulanic* pada *Streptomyces clavuligerus* dan produksi bioinsektisida pada *Bacillus thuringensis* (Arshad *et al.*, 2010). Mutasi ini menghasilkan perubahan produksi metabolit sekunder dan enzim. Biasanya mutasi menyebabkan kematian sehingga peningkatan jumlah radiasi UV berhubungan dengan peningkatan kematian sel. Jumlah koloni yang tumbuh setelah mendapat perlakuan sinar UV selama 10-30 menit cenderung menurun. Hal ini terjadi karena sinar UV merupakan salah satu cara untuk mensterilisasi bakteri

sehingga tidak banyak koloni yang bertahan hidup.

Perlakuan mutasi dengan sinar UV selama 20 menit menghasilkan mutan dengan produksi IAA tertinggi dibandingkan dengan galur induk. Hal ini mungkin disebabkan periode waktu penyinaran UV selama 20 menit lebih tepat untuk menginduksi mutasi galur tersebut. Penurunan produksi IAA di bawah galur induk terjadi pada perlakuan 10 dan 30 menit. Sudha *et al.* (2012) melaporkan bahwa galur induk *Rhizobium* yang dimutasi secara fisik dengan radiasi UV selama interval waktu 5, 10 dan 15 menit dapat menurunkan produksi IAA.

Mutasi secara kimia dengan menggunakan asam nitrat juga mempengaruhi jumlah koloni dan produksi IAA (Tabel 3). Jumlah koloni mutan menurun setelah diberi perlakuan selama 30-120 menit. Pengaruh mutasi asam nitrat pada isolat TC 4.3.1.2 menunjukkan peningkatan produksi IAA. Produksi IAA dari mutan asam nitrat meningkat 14,62-38,15% lebih tinggi daripada galur induk. Mutan TC 4.3.1.2 pada perlakuan 60 menit menunjukkan produksi IAA tertinggi (24,48 µg/ml), sedangkan produksi IAA terendah setelah perlakuan 120 menit (20,31 µg/ml).

Tabel 3. Pengaruh asam sitrat terhadap jumlah koloni dan produksi IAA

Waktu perlakuan (menit)	Jumlah koloni (per ml)	Produksi IAA (µg/ml)
30	7 x 10 ⁵	22,34
60	2 x 10 ⁶	24,48
90	1 x 10 ⁷	20,73
120	1 x 10 ⁷	20,31

Asam nitrat sebagai zat mutagenik dapat menyebabkan kematian organisme atau mutasi. Jumlah koloni mutan menurun pada perlakuan asam nitrat selama 30 menit. Bertambahnya dosis mutagen maupun lamanya terpapar zat mutagenik akan meningkatkan kematian sel (Arshad *et al.*, 2014). Pada perlakuan 60-120 menit, jumlah koloni mutan yang tumbuh lebih banyak dibandingkan perlakuan 30 menit.

Hal ini bisa terjadi ketika mutagenik seperti asam nitrat merusak DNA maka sifat ketahanan alami dari suatu bakteri akan meningkat melalui proses mutasi dan seleksi. Lebih rendahnya jumlah koloni mutan pada perlakuan 30 menit bisa disebabkan adanya *microbial mat* yang melindungi sel hidup sehingga koloni yang bermutasi sulit dideteksi (Arshad *et al.*, 2014). Mutagen kimia seperti asam nitrat bertindak dengan memodifikasi basa secara kimia pada DNA sehingga menghasilkan basa berbeda. Asam nitrat menyebabkan deaminasi oksidatif dimana gugus asam amino diubah menjadi kelompok keto sehingga residu sitosin akan diubah menjadi *urasil* (Najafi & Pezeskho, 2013).

Perlakuan mutasi dengan asam nitrat menghasilkan mutan dengan produksi IAA lebih tinggi daripada galur induk. Produksi IAA mutan meningkat pada perlakuan selama 30-60 menit, sedangkan pada perlakuan selama 90-120 menit, produksi IAA menurun tetapi masih lebih tinggi daripada galur induk. Hal ini mengindikasikan bahwa asam nitrat mungkin lebih efektif dalam menghasilkan mutan dengan produksi IAA lebih tinggi. Sinar UV dan asam nitrat biasanya digunakan untuk peningkatan galur. Jika membandingkan produksi hormon IAA, mutasi dengan asam nitrat memberikan hasil yang lebih tinggi daripada mutasi menggunakan sinar UV. Hal ini bisa disebabkan oleh pengaruh asam nitrat yang mampu merubah susunan DNA secara permanen dan mutagen asam nitrat sesuai dengan peningkatan produksi hormon IAA (Aftab *et al.*, 2012); Suribabu *et al.*, 2014). Hasil penelitian lain yang dilakukan oleh Chidananda *et al.* (2008) menunjukkan bahwa *Aspergillus niger* CFTRI 1105 yang dimutasi dengan asam nitrat dapat meningkatkan produksi *asperenone* dibandingkan dengan mutasi UV. Suribabu *et al.* (2014) juga menyatakan bahwa penggunaan mutagen kimia seperti asam nitrat lebih efektif untuk meningkatkan mutu galur daripada mutagen fisik (sinar UV). Keberhasilan perbaikan galur tergantung pada penggunaan prosedur mutagenesis secara optimal dan

dikombinasikan dengan sistem yang efektif untuk menseleksi galur berproduksi tinggi (Pradhan *et al.*, 2013).

4. KESIMPULAN

Bakteri dari bintil akar tanaman turi sebanyak 15 isolat telah diseleksi kemampuannya dalam menghasilkan hormon IAA. Isolat TC 4.3.1.2 menghasilkan IAA tertinggi sebesar 17,72 µg/ml. Hasil identifikasi molekuler menunjukkan bahwa isolat TC 4.3.1.2 adalah *Rhizobium sp* BGC8. Mutasi menggunakan asam nitrat selama waktu 30-120 menit dan sinar UV pada waktu penyinaran 20 menit terhadap isolat TC 4.3.1.2 mampu meningkatkan produksi IAA.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini terlaksana dengan dukungan dana DIPA 2016 Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI. Ucapan terima kasih disampaikan kepada *Indonesian Culture Collection* (InaCC) atas bantuannya dalam analisis sekuen.

DAFTAR PUSTAKA

- Aftab, M.N., ul-Haq, I. & Baig, S. (2012). Systematic Mutagenesis Method for Enhanced Production of Bacitracin by *Bacillus licheniformis* Mutant Strain UV-MN-HN-6. *Brazilian Journal of Microbiology*, 78-88.
- Arshad, R., Farooq, S. & Ali, S.S. (2010). Improvement of penicillin G acylase in *Eschericia coli* through UV induced mutations. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, 1133-1141.
- Bhardwaj, D., Ansari, M.W., Sahoo, R.J. & Tuteja, N. (2014). Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. *Microbial Cell Factories*, 13(1), 1-9.
- Chidananda, C., Kumar, C.M., & Sattur, A.P. (2008). Strain improvement of *Aspergillus niger* for the enhanced production of asperenone. *Indian Journal of Microbiology*, 48, 274-278. DOI: 10.1007/s12088-008-0026-1.

- Das, K., Prasanna, R., & Saxena, A.K. (2017). *Rhizobia*: a potential biocontrol agent for soilborne fungal pathogens. *Folia Microbiology*, 62(5), 425-435. doi: 10.1007/s12223-017-0513-z.
- Dey, R., Pal, K.K., Bhat, D.M., & Chauhan, S.M. (2004). Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogea* L.) by application of plant growth promotion rhizobacteria. *Microbiology Research*, 159, 371-394.
- Goodarzi, A. (2016). UV-induced mutagenesis in lactic acid bacteria. *International Journal of Genetics and Genomics*, 4(1), 1-4. doi: 10.11648/j.ijgg.20160401.11.
- Gopalakrishnan, S., Sathya, A., Vijayabharathi, R., Varshney, R.K., Gowda, C.L.L. & Krishnamurthy, L. (2015). Plant growth promoting *Rhizobia*: challenges and opportunities. *Biotechnology*, 5, 355-377. DOI 10.1007/s13205-014-0241-x.
- Jhon, R.P., & Nampoothiri, K.M. (2008). Strain improvement of *Lactobacillus delbrueckii* using nitrous acid mutation for L-lactic acid production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 3105-3109. DOI 10.1007/s11274-008-9826-z.
- Kamala Kumari, P.V., Sankar, G.G. & Prabhakar, T. (2015). Strain improvement studies for the production of L-asparaginase by *Beauveria bassiana* SS18/41. *International Journal Pharmaceutical Science and Research*, 31(2), 173-176.
- Kumar, A.K. (2015). UV mutagenesis treatment for improved production of endoglucanase and β -glucosidase from newly isolated thermotolerant actinomycetes, *Streptomyces griseoaurantiacus*. *Bioresources Bioprocessing*, 2, 1-10. DOI 10.1186/s40643-015-0052-x.
- Mohite, B. (2013). Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. *International Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 13(3), 638-649.
- Najafi, M.B.H. & Pezeshki P. (2013). Bacterial mutation; types, mechanisms and mutant detection methods: a review. *European Scientific Journal*, 4, 628-638.
- Parekh, S., Vinci, V.A. & Strobel, R.J. (2000). Improvement of microbial strains and fermentation processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54(3), 287-301.
- Pradhan, B., Dash, S.K., & Sahoo, S. (2018). Strain improvement of isolated *Bacillus subtilis* strain HSWX88 for extracellular L-asparaginase production. *International Journal of Pharmaceutical and Industry Research*, 3, 288-294.
- Raju, E.V.N. & Divakar, G. (2013). *Bacillus cereus* GD 55 Strain Improvement by Physical and Chemical Mutagenesis for Enhanced Production of Fibrinolytic Protease. *International Journal of Pharma Sciences and Research*, 4(5), 81-93.
- Saxena, S. (2015). Strategies of strain improvement of industrial microbes. *Applied Microbiology*, pp. 155-171. DOI: 10.1007/978-81-322-2259-0.
- Spaepen, S., Vanderleyen, J. & Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, 31(4), 425-448.
- Sridevi, M. & Mallailah, K.V. (2007). Bioproduction of indole acetic acid by *Rhizobium* strains isolated from root nodules of green manure crop, *Sesbania sesban* (L.) Merr. *Iran Journal of Biotechnology*, 5(3), 178-182.
- Sudha, M., Gowri, R.S., Prabhavathi, P., Astapriya, P., Devi, S.Y. & Saranya, A. (2012). Production and optimization of indole acetic acid by indigenous micro flora using agro waste as substrate. *Pakistan Journal Biological Science*, 15(1), 39-43.
- Suribabu, K., Govardhan, T.L. & Hemalatha K.P.J. (2014). Strain improvement of *Brevibacillus borostelensis* R1 for optimization of α -amylase production by mutagens. *Journal of Microbiology and Biochemical Technology*, 6(3), 123-127. Doi.org/10.4172/1948-5948.1000132.