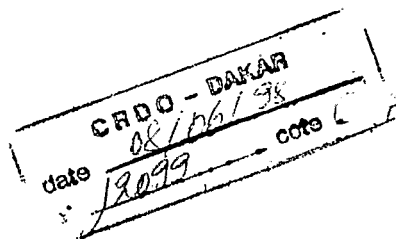


Viabilité d'un inoculum déterminée par l'activité réductrice de l'INT

Y. PRIN, M. NEYRA, M. DUCOUSSO,

Y.-R. DOMMERGUES (1)



RÉSUMÉ — Les arbres vivent naturellement en symbiose avec des microorganismes du sol. Le déficit en microorganismes symbiotiques rencontré dans les sols dégradés ou marginaux ou en cas d'introduction d'espèces nouvelles peut être corrigé par l'inoculation en pépinière. La culture pure de la plupart de ces microorganismes est maintenant possible, mais, afin de produire des inoculums de bonne qualité, il est nécessaire de connaître à tous les stades de fabrication et d'utilisation de l'inoculum l'état de viabilité du microorganisme. C'est pourquoi nous avons mis au point une méthode originale d'estimation de la viabilité des microorganismes filamenteux. Cette méthode (appelée IRA) est fondée sur l'utilisation d'un sel de tétrazolium incolore qui est réduit par les cellules vivantes en cristaux de formazan, de couleur rouge. Les cristaux formés dans les cellules vivantes des microorganismes sont extraits dans le méthanol chaud puis dosés par spectrophotométrie. Cette méthode permet d'estimer la viabilité aussi bien d'une bactérie filamenteuse, *Frankia* sp. que d'un champignon mycorhizien, *Pisolithus* sp. et permet également d'optimiser chaque étape de la production des inoculums. L'introduction de la méthode IRA dans la technologie des inoculums permettra ainsi d'économiser l'inoculum et de contribuer à la réussite de l'inoculation en pépinière.

Mots clés : *Frankia*, *Pisolithus*, viabilité, INT, inoculum, alginate.

Il est bien établi que la plupart des espèces forestières vivent en symbiose avec des microorganismes du sol. Ces symbioses jouent un rôle très important dans la nutrition minérale du végétal, notamment en fournissant une partie parfois importante de l'azote qui lui est nécessaire par la fixation biologique de l'azote pour les légumineuses (symbiose à *Rhizobium*) ou pour les plantes actinorhiziennes (symbiose à *Frankia*) ; également en améliorant sa nutrition en phosphore et autres éléments minéraux ainsi qu'en développant sa résistance à la sécheresse (pour les plantes mycorhizées). Dans un certain nombre de cas [sols dégradés, sols marginaux, introduction d'espèces nouvelles] ces symbioses s'établissent mal (ceci peut être lié à l'insuffisance ou à l'absence de microorganisme symbiotique dans le sol) ou fonctionnent mal (en raison de la non efficacité du microorganisme).

(1) BSSFT (CTFT/ORSTOM/CNRS), 45 bis, avenue de la Belle Gabrielle, 94736 Nogent-sur-Marne Cedex.

On peut remédier à cette situation en apportant en pépinière le microorganisme symbiotique performant : c'est l'inoculation. Des expériences d'inoculation réalisées avec des bactéries (CORNET et DIEM, 1982 ; SOUGOUFARA *et al.*, 1989) et des champignons mycorhiziens (DELWALLE *et al.*, 1982 ; GARBAYE, 1988) ont montré l'effet bénéfique de l'inoculation sur la productivité forestière. La souche bactérienne ou mycorhizienne préalablement cultivée *in vitro* est apportée sous forme d'inoculum, c'est-à-dire adsorbée sur un support ou incluse dans un polymère. Le problème majeur qui se pose au cours de la préparation, du stockage et de l'utilisation de tous les inoculums est celui du maintien de la viabilité des cellules microbiennes après leur croissance *in vitro*. En effet, la culture microbienne initiale est soumise à différentes contraintes capables d'entraîner la mort d'une partie des cellules microbiennes au cours des opérations de conditionnement, de stockage et de transport, et d'inoculation en pépinière. Il est donc important de pouvoir disposer d'une technique simple d'estimation de la masse de cellules métaboliquement actives qui peut être considérée comme une mesure de la viabilité de l'inoculum.

Parmi les tests qui existent actuellement pour estimer la viabilité d'un microorganisme, citons :

- le dénombrement des cellules vivantes par dilution-étalement : on ensemence un milieu solide avec des dilutions de la culture bactérienne. Après incubation, des colonies apparaissent dans le milieu ; chaque colonie étant issue d'au moins une bactérie vivante, on en déduit le nombre de bactéries présentes au départ ;
- la mesure quantitative de l'Adénosine TriPhosphate (ATP) ;
- l'examen microscopique après traitement avec certains fluorochromes ou avec des sels de tétrazolium : les cellules vivantes apparaissent fluorescentes ou colorées ; le rapport au nombre total de cellules permet d'établir le pourcentage de cellules vivantes ;
- la respirométrie : on mesure dans la culture la consommation d'oxygène ou la production de gaz carbonique des cellules.

Les techniques de comptage sous microscope et la technique de dénombrement par dilution-étalement donnent de bons résultats avec des organismes unicellulaires ou particuliers mais s'adaptent mal aux microorganismes filamenteux. Or de nombreux microorganismes susceptibles d'être produits en vue de l'inoculation sont filamenteux, comme certains actinomycètes ou



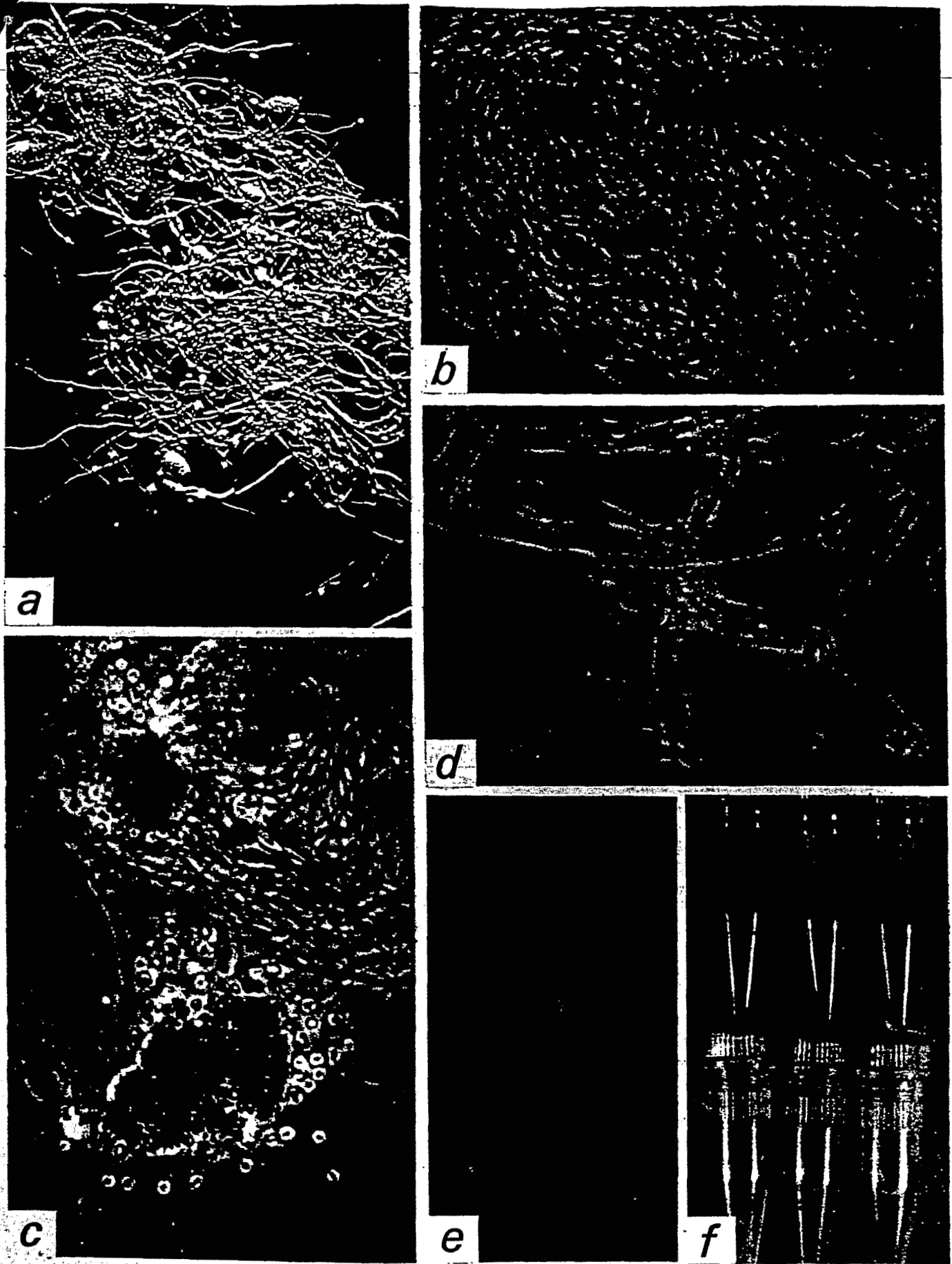


FIGURE 1 : - a à d : Accumulation de cristaux rouges d'INTF dans les cellules ; a : culture de Frankia sp. avant traitement INT ($\times 1\ 400$) ; b : culture jeune (10 jours) de Frankia traitée par l'INT ($\times 1\ 800$) ; c : culture de Frankia âgée de 3 semaines, seuls les sporanges ont réduit l'INT ($\times 1\ 800$) ; d : culture de Pisolithus sp. après traitement INT ($\times 1\ 500$) ; - e, f : Application de la méthode IRA au contrôle de l'inclusion de Pisolithus sp. dans l'alginate ; e : Comparaison de billes d'alginate contenant des colonies de Pisolithus sp. avant (boîte de gauche) et après (boîte de droite) traitement à l'INT. Les colonies apparaissent colorées en rouge vif alors que l'alginate ne présente aucune coloration ($\times 2,5$) ; f : comparaison de l'activité IRA de Pisolithus sp. mélangé à de l'alginate, avant (tubes du haut) et après (tubes du bas) passage dans le chlorure de calcium. On voit que le traitement au chlorure de calcium est responsable d'une chute très importante de la viabilité du champignon.

les champignons mycorhiziens. Les techniques de dosage de l'ATP et de respirométrie, applicables à ces microorganismes filamenteux, nécessitent un appareillage spécifique, des réactifs coûteux et une standardisation longue et délicate. C'est pourquoi nous avons cherché à développer, au laboratoire de Biotechnologie des Systèmes Symbiotiques Forestiers Tropicaux, une technique simple d'estimation de la viabilité d'un microorganisme en vue de l'appliquer aux inoculums.

Nos travaux ont porté tout d'abord sur deux microorganismes symbiotiques, une bactérie fixatrice d'azote, *Frankia* sp. et un champignon ectomycorhizien, *Pisolithus* sp.

Matériels et méthodes

Principe de la méthode IRA

La technique proposée est fondée sur l'utilisation d'un sel de tétrazolium : le chlorure de 2-(p-iodophényl)-3-(p-nitrophényl)-5-phényl tétrazolium (INT). Au cours de la respiration, les cellules vivantes réduisent l'INT soluble et incolore à l'état oxydé en cristaux d'INT-Formazan (INTF), de couleur rouge. Cette transformation de l'INT en INTF reflète l'activité respiratoire des cellules et peut être interprétée comme une indication de la viabilité du microorganisme (BITTON et KOOPMAN, 1982). L'accumulation des cristaux à l'intérieur des cellules a souvent été utilisée en microscopie pour estimer la viabilité (FAURE-RAYNAUD *et al.*, 1986). La figure 1 montre une culture pure de *Frankia* sp. avant (figure 1a) et après (figure 1b) traitement à l'INT. Après traitement, les filaments, ou hyphes bactériens, ont une couleur rouge due à l'accumulation, à l'intérieur des cellules, des cristaux d'INTF. Dans une culture plus âgée, seuls les sporanges contiennent des cristaux d'INTF, les hyphes étant presque tous morts (figure 1c). La figure 1d montre l'accumulation des cristaux d'INTF dans les hyphes de *Pisolithus* sp. L'estimation de la viabilité par l'observation au microscope reste cependant essentiellement qualitative en ce qui concerne les microorganismes filamenteux. Afin de rendre cette méthode quantitative, nous avons donc cherché à solubiliser et extraire les cristaux d'INTF pour déterminer ensuite par spectrophotométrie l'intensité de la coloration rouge de l'extrait.

Extraction

Le premier problème posé dans la mise au point du protocole de mesure de la viabilité a donc été l'extraction des cristaux d'INTF formés dans les cellules. Après essai de divers solvants, nous avons pu montrer que le méthanol à chaud (70 °C) donnait de bons résultats, le critère essentiel de l'extraction étant la décoloration totale du culot bactérien. La figure 2 montre que la coloration rouge prise par le méthanol est stable à l'obscurité et peut très bien se conserver 24 heures.

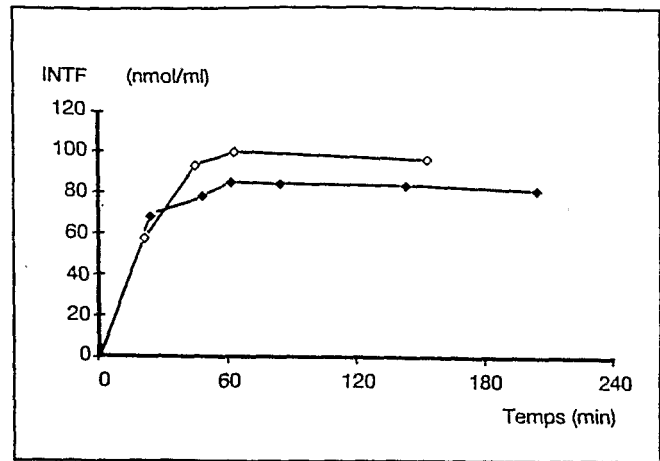


FIGURE 2 : Variation de la densité optique (DO : absorbance à 490 nm) d'une solution d'INTF à une concentration de 21 nmol/ml dans le méthanol en fonction du temps de conservation à la lumière ou à l'obscurité.

Détermination des conditions optimales de réduction de l'INT

Après avoir mis au point la technique assurant une extraction complète des cristaux d'INTF, nous avons pu définir les modalités d'incubation de la culture en présence d'INT ; en particulier, nous avons suivi la cinétique de réduction de l'INT dans les cellules de *Frankia* cultivé en milieu liquide ainsi que l'influence de la concentration en INT sur la cinétique de réduction de l'INT par *Pisolithus* sp. cultivé en milieu solide.

- *Frankia* sp. (cas d'une culture en milieu liquide) :

A une culture liquide de *Frankia* homogénéisée, nous avons ajouté 10 % d'une solution d'INT (à 0,2 % dans l'eau distillée). Nous avons prélevé stérilement des fractions de cette culture, après des temps d'incubation de 0 à 3 heures. Pour chaque prélèvement, nous avons réalisé l'extraction et de dosage de l'INTF. Pour les deux souches étudiées, la figure 3 montre qu'un palier est atteint après une incubation de 1 heure.

- *Pisolithus* sp. (cas d'une culture en milieu solide) :

Nous avons directement immergé le mycélium de *Pisolithus* sp. et son milieu de culture dans des solutions d'INT à 0,005 %, 0,02 %, 0,05 %, 0,1 %, 0,2 %. Les temps d'incubation se sont échelonnés entre 0 et 18 heures. En culture pure, *Pisolithus* sp. produit des pigments bruns qui après extraction dans le méthanol à 70 °C ont un maximum d'absorbance à 360 nm. Bien que ces pigments interfèrent peu dans la lecture à 490 nm de la concentration en INTF, nous avons estimé nécessaire de faire la lecture de référence sur une culture soumise au même protocole mais non traitée avec l'INT. La figure 4 montre que les concentrations d'INT égales ou supérieures à 0,05 %, ont atteint un plateau en 1 heure. On pourrait donc utiliser l'une ou l'autre de ces concentrations, mais en fait nous avons adopté la concentration à 0,2 %, habituellement utilisée avec *Frankia*. Afin d'être certain d'effectuer les mesures au niveau du plateau, nous avons retenu un temps d'incubation de 2 heures.

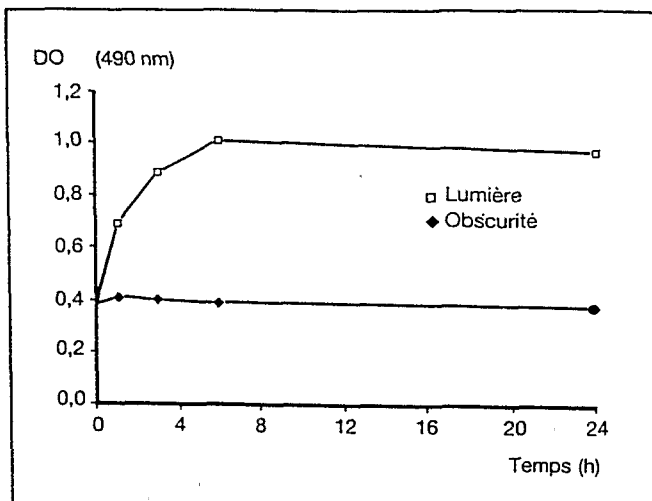


FIGURE 3 : Cinétique de réduction de l'INT en INTF par deux souches de *Frankia* sp.
 ◇ ACN₁Ag (souche isolée d'*Alnus crispa*).
 ◆ CeF (souche isolée de *Casuarina equisetifolia*).

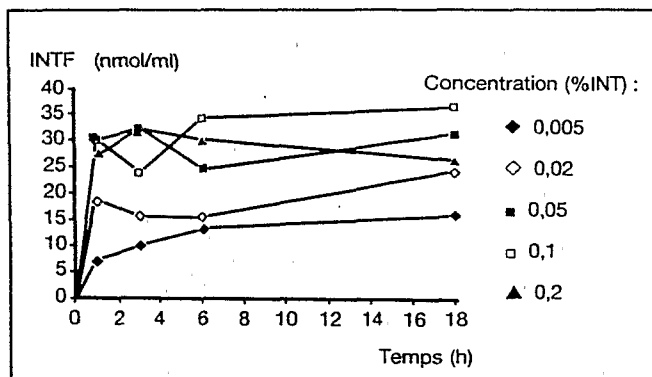


FIGURE 4 : Effet de la concentration d'INT (0,005 à 0,2 % dans l'eau distillée) sur la cinétique d'apparition d'INTF par *Pisolithus* sp. (souche ORS 7870). Pour les concentrations 0,005 ; 0,02 ; 0,05 ; 0,1 et 0,2 %, l'erreur standard des courbes est respectivement de 1,67 ; 2,04 ; 2,89 ; 3,17 et 2,99.

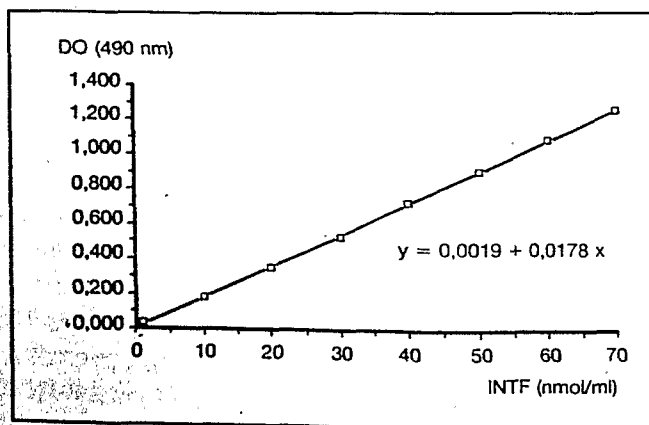


FIGURE 5 : Courbe-étalon : densité optique (DO : absorbance à 490 nm) en fonction de la concentration en INTF.

Gamme-étalon

Les résultats des mesures de spectrophotométrie, exprimés en absorbance, sont convertis en moles d'INTF grâce à une courbe-étalon établie en réalisant des dilutions dans le méthanol entre 10^{-5} et $7 \cdot 10^{-5}$ mol/l d'INTF commercial (figure 5). Les résultats obtenus sont tout à fait reproductibles.

Méthode IRA : protocole type

A partir de ces résultats, on peut proposer le protocole suivant, pour l'estimation de la viabilité de *Frankia* sp. ; ce protocole type est donné pour une culture en milieu liquide et peut être adapté en fonction du microorganisme et/ou des caractéristiques de la culture. En effet, nous avons pu montrer que cette méthode que nous appellerons IRA (pour « INT Reducing Activity ») pouvait être utilisée avec des microorganismes cultivés sur divers supports comme la cellulose, la vermiculite ou la perlite.

RÉACTIFS :

- INT à 0,2 % dans l'eau distillée.
- Méthanol absolu.

MODE OPÉRATOIRE :

- à 1 ml de culture homogénéisée, ajouter 100 µl de la solution d'INT ;
- incubé 60 minutes à l'obscurité, à la température de croissance du microorganisme ;
- centrifuger 10 minutes à 15 000 g ;
- éliminer complètement le surnageant ;
- ajouter 1 ml de méthanol ;
- incubé au bain-marie à 70 °C jusqu'à décoloration complète du culot ;
- centrifuger 3 minutes à 15 000 g ;
- lire à 490 nm l'absorbance du surnageant.

GAMME-ÉTALON

- préparer une gamme de concentrations d'INTF dans le méthanol de 10^{-5} à $7 \cdot 10^{-5}$ mol/l ;
- lire l'absorbance à 490 nm.

Application de la méthode IRA au contrôle de la viabilité des microorganismes au cours des différentes étapes de fabrication et d'utilisation des inoculums

A quel stade de la croissance faut-il arrêter une culture microbienne, pour procéder au conditionnement de l'inoculum ? La méthode IRA répond à cette question, en permettant d'estimer la variation au cours du temps de la viabilité de la culture concernée.

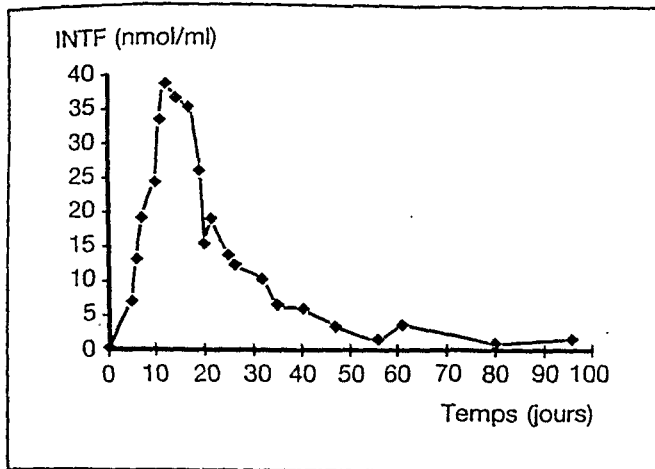


FIGURE 6 : Variation au cours du temps de l'activité réductrice d'INT (IRA), interprétée comme une mesure de la viabilité de *Frankia* sp. (souche ORS 020607) cultivé en milieu liquide (milieu BAP, 28 °C, sans agitation).

Frankia sp. cultivé en milieu liquide :

Un exemple de ce type d'étude est illustré par la figure 6, qui montre l'existence d'un pic de viabilité entre le 13^e et le 14^e jour de culture dans le cas d'une culture en batch (sur milieu BAP, [Murry, 1984], sans agitation). La chute brutale de viabilité suivant le pic n'est reflétée que d'une manière très atténuée par la technique classique de dosage des protéines (PRIN *et al.*, 1988). D'un point de vue pratique, ce résultat indique que le conditionnement de l'inoculum doit obligatoirement être effectué aussi rapidement que possible dès que ce pic est atteint.

Pisolithus sp. cultivé en milieu solide

La persistance des structures végétatives, hyphes et rhizomorphes formés par le champignon pose un problème dans l'estimation de sa viabilité par la mesure de la biomasse mycélienne. Dans ce cas, nous avons cultivé la souche de *Pisolithus* sp. ORS 7870 sur milieu MNM gélosé (MARX, 1969). Les mesures d'IRA réalisées sur des boîtes de cultures entières indiquent une augmentation au cours du temps de la quantité d'INTF formé par les colonies de *Pisolithus* sp. Cependant, si l'on rapporte ces valeurs au poids de mycélium sec, on observe alors une importante chute de la viabilité pendant la deuxième semaine de culture, puis une stabilisation de ce rapport à partir de la troisième semaine de culture (figure 7). Ces résultats indiquent qu'il est impératif de repiquer le mycélium pendant la deuxième semaine de culture, si l'on veut être certain que le microorganisme utilisé soit parfaitement viable.

Amélioration de la survie du microorganisme au cours des opérations de conditionnement

Par conditionnement, on entend les différentes opérations qui aboutissent à la formulation d'un inoculum. Une méthode de conditionnement très classique consiste

à adsorber les cultures sur un support (tourbe le plus souvent). Une technique de remplacement particulièrement prometteuse consiste à inclure les cellules dans un polymère (DIEM *et al.*, 1988). Le polymère le plus fréquemment utilisé est l'alginate. Dans ce cas, l'inoculum frais se présente sous forme de billes à l'intérieur desquelles le microorganisme peut éventuellement poursuivre sa croissance. La figure 1e illustre l'aspect de billes d'alginate fraîches, contenant des colonies de *Pisolithus* sp. avant et après traitement IRA. Lorsque l'optimum de croissance est atteint, les billes sont déshydratées en vue de leur conservation avant l'expédition sur les lieux d'inoculation. Sous cette forme déshydratée, le polymère protège efficacement le microorganisme ; en outre, l'expédition est facilitée car le poids d'un tel inoculum est bien inférieur à celui des inoculums traditionnels sur tourbe.

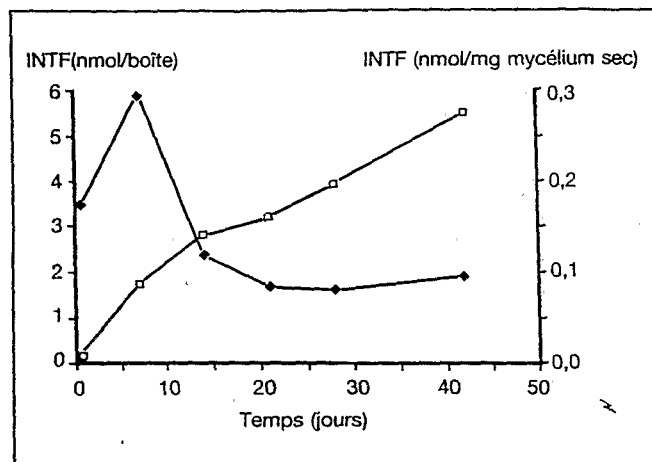


FIGURE 7 : Variation en fonction du temps de la viabilité de *Pisolithus* sp. :
□ : Viabilité exprimée en nmol d'INTF/boîte ;
◆ : Viabilité exprimée en nmol d'INTF/mg de mycélium (poids sec).

Au cours de ces deux étapes successives (inclusion dans l'alginate puis déshydratation des billes obtenues), il existe un risque de mortalité important. En particulier l'inclusion dans l'alginate nécessite la polymérisation de ce dernier sous l'effet d'une solution de chlorure de calcium. La figure 1f montre une chute très nette de l'activité IRA d'un inoculum de *Pisolithus* sp. au cours de la phase de polymérisation. Grâce à l'introduction de la méthode IRA, il nous a été possible d'entreprendre des recherches – en particulier sur de nouvelles solutions de polymérisation – pour réduire la mortalité des microorganismes au cours des opérations de conditionnement.

Contrôle de la viabilité des inoculums

Après conditionnement, les inoculums sont stockés sous forme déshydratée jusqu'à l'utilisation en pépinière. Il est donc important de contrôler la survie des microorganismes qui sont placés dans des conditions qui ne

sont pas toujours optimales, en particulier pendant le transport. Les résultats préliminaires obtenus suggèrent une bonne survie de *Frankia* sp. inclus en billes d'alginate. Des expériences d'inoculation réalisées sur le terrain (Sénégal) ont permis de montrer que l'on pouvait conserver un inoculum de *Frankia* sp. en billes séchées pendant 2 années à température ambiante et obtenir une très bonne nodulation de *Casuarina equisetifolia* (SOU-GOUFARA *et al.*, 1989).

Grâce à la méthode IRA, il est possible non seulement de suivre de façon quantitative la survie au cours du stockage et du transport mais aussi de proposer des approches permettant d'améliorer la survie du microorganisme en fonction des conditions de conservation et de transport (température, lumière et humidité), par exemple en stimulant la production de structures de résistance (spores, sclérotés,...) ou en ajoutant des substances protectrices (kaolin...).

En permettant d'estimer la masse de cellules vivantes dans un inoculum, la méthode IRA peut également contribuer à définir les doses optimales d'inoculum à appliquer aux plants. En effet, aucune donnée précise et chiffrée n'existe à l'heure actuelle concernant les doses d'inoculum avec des microorganismes filamenteux comme *Frankia* ou *Pisolithus*. Par des expériences menées sur le terrain, nous espérons pouvoir proposer des « normes de qualité » de l'inoculum de *Frankia* sp. et de *Pisolithus* sp. et d'autres microorganismes, afin d'optimiser l'emploi.

Conclusion

La méthode IRA développée au BSSFT s'avère être un outil précieux de contrôle de la viabilité des microorganismes symbiotiques tout au long des différentes étapes de préparation des inoculums. Elle peut permettre également de connaître les quantités minimales de cellules bactériennes ou fongiques suffisantes pour assurer une nodulation ou une mycorhization optimale des plants et accessoirement de réaliser une économie substantielle d'inoculum.

La méthode IRA dont la mise en œuvre est simple et rapide, trouve une autre application intéressante au laboratoire où elle permet de faciliter la gestion des collections de souches bactériennes ou fongiques.

On peut envisager l'extension de l'IRA au contrôle de la qualité des inoculums commerciaux à la fois au niveau de l'industrie et au niveau de l'utilisateur auquel il serait possible de fournir un « kit IRA » permettant de s'assurer sur place, au moment de l'utilisation, de la qualité de l'inoculum.

Références bibliographiques

- BITTON G., KOOPMAN B. 1982. Tetrazolium reduction-malachite green method for assessing the viability of filamentous bacteria in activated sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 43, 964-966.
- CORNET F., DIEM H.G., 1982. Etude comparative de l'efficacité des souches de *Rhizobium* d'acacia isolées de sols du Sénégal et effet de la double symbiose *Rhizobium-Glomus mosseae* sur la croissance de *Acacia holosericea* et *A. raddiana*. *Bois et Forêts des Tropiques*, 198, 3-15.
- DELWAULLE J.C., GARBAYE J., OKOMBI G., 1982. Stimulation de la croissance initiale de *Pinus caribaea* Morelet dans une plantation du Congo par contrôle de la mycorhization. *Bois et Forêts des Tropiques*, 196, 25-32.
- DIEM H.G., BEN KHALIFA K., NEYRA M., DOMMERGUES Y.R., 1988. Recent advances in the inoculant technology with special emphasis on plant symbiotic microorganisms. Workshop on *Advanced technologies for increased agricultural production: actual situation, future prospects and concrete possibilities of application in developing countries* (Santa Margherita Ligure, Italia, 25-29 September 1988) (sous-presse).
- FAURE-RAYNAUD M., BONNEFOY M.A., MOIROUD A., 1986. Influence des pH acides sur la variabilité d'isolats de *Frankia*. *Plant and Soil*, 96 (3), 347-358.
- GARBAYE J., 1988. Les plantations forestières tropicales : un champ d'application privilégié pour la mycorhization contrôlée. *Bois et Forêts des Tropiques*. 216, 23-34.
- MARX D.H., 1969. The influence of ecto-trophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infection. I - Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic and soil bacteria. *Phytopathology* 59 (1) : 153-163.
- PRIN Y., NEYRA M., DIEM H.G., 1988. Evaluation of *Frankia* growth and viability using Bradford protein and INT reduction tests. *7th International Conference on Frankia and Actinorhizal Plants*: Univ. Conn., Storrs, USA, 7-10 August 1988.
- SOU-GOUFARA B., DIEM H.G., DOMMERGUES Y.R., 1989. Response of field-grown *Casuarina equisetifolia* to inoculation with *Frankia* strain ORS 021001 entrapped in alginate beads. *Plant and Soil* (sous presse).

Summary

PRIN Y., NEYRA M., DUCOUSSO M., DOMMERGUES Y.R. – Inoculum viability as determined by the reducing activity of INT.

Trees live naturally in symbiotic association with soil microorganisms. The symbiotic microorganism deficiency found in degraded or marginal soils, or when new species are introduced, can be corrected by nursery inoculation. The pure culture of most of these microorganisms is possible. However to produce good quality inoculants the viability of the microorganism has to be known at each step of the processing and use of the inoculum. An original method for estimating the viability of filamentous microorganisms was developed. This method (called IRA method) is based on the property of a colorless tetrazolium salt reducing to red colored formazan crystals by living cells. The crystals formed in the living cells of microorganisms are extracted in hot methanol and then determined by spectrophotometry. It is possible by using this method to estimate the viability of both a filamentous bacterium such as *Frankia* sp. and a mycorrhizal fungus, *Pisolithus* sp. also to optimize inoculum production at every stage. When applied to inoculum technology the IRA method will make it possible the save inoculum and to promote successful nursery inoculation.

Key words : *Frankia*, *Pisolithus*, viability, INT, inoculum, alginate.

Resumen

PRIN Y., NEYRA M., DUCOUSSO Y.R., DOMMERGUES Y.R., – Viabilidad de un inóculo determinada por la actividad reductora de INT.

Los árboles viven naturalmente en simbiosis con microorganismos del suelo. El déficit de microorganismos simbióticos que se observa en los suelos deteriorados o marginales, o en caso de introducción de nuevas especies, se puede corregir mediante inoculación en vivero. Hoy día, se pueden obtener, por medio de cultivo puro, la mayoría de esos microorganismos, pero, para producir inóculos de buena calidad, se debe conocer, en todas las etapas de fabricación y utilización del inóculo, el estado de viabilidad del microorganismo. Por eso, hemos elaborado un método original de evaluación de la viabilidad de los microorganismos filamentosos. Dicho método (denominado IRA) se basa en la utilización de una sal de tetrazolio incolora, que las células vivas transforman en cristales de formázan, de color rojo. Los cristales formados en las células vivas de los microorganismos se extraen en metanol caliente y se dosifican mediante espectrofotometría. Este método permite estimar, tanto la viabilidad de una bacteria filamentosas, *Frankia* sp., como la de un hongo micorrizo, *Pisolithus* sp., y permite optimizar las distintas etapas de producción de inóculos. La introducción del método IRA en la tecnología de los inóculos permitirá por consiguiente economizar inóculo y contribuir al éxito de la inoculación en vivero.

Palabras-clave : *Frankia*, *Pisolithus*, viabilidad, INT, inóculo, alginato.