



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Genètica i Microbiologia

Facultat de Biociències

PROCESSOS MICROBIOLÒGICS APLICATS A LES UNITATS CANINES DE BIODETECCIÓ

Memòria presentada per optar al grau de Doctor per la Universitat Autònoma de
Barcelona

Autor: Lluís Pons Anglada

Directora: Dra. Maria dels Àngels Calvo Torras

Tutor: Dr. Jordi Barbé Garcia

2016



Universitat Autònoma de Barcelona

**M^a ÀNGELS CALVO TORRAS, CATEDRÀTIC DE SANITAT ANIMAL
DEL DEPARTAMENT DE SANITAT I D'ANATOMIA ANIMALS DE LA
UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA**

CERTIFICA:

Que la tesis doctoral titulada “Processos microbiològics aplicats a les Unitats Canines de Biodetecció”, de la que és autor el llicenciat en Veterinària Lluís Pons Anglada, s’ha realitzat sota la seva direcció.

I perquè consti, als efectes de ser presentada per optar al grau de Doctor, firma el present a Bellaterra a dotze de maig de dos mil setze

Dra. M. Àngels Calvo Torras

Edifici V. Campus de la UAB. 08193
Bellaterra (Cerdanyola del Vallès). Barcelona. Spain.

www.uab.cat

Veritas in Simpliciter

AGRAÏMENTS

Aprofito l'ocasió per donar les gràcies més sinceres a totes les persones que han col·laborat de diferents maneres en aquesta tesi, que no són poques.

En primer lloc, a la Dra. Maria dels Àngels Calvo Torras per la seva confiança en les meves idees i propostes, per la seva passió per la feina, la ciència i l'ensenyança i, sobretot, per acollir-me com a doctorand quan em vaig presentar fa uns anys amb el cap ple de projectes, les mans buides i una il·lusió terrible per asseure'm a la taula rodona del seu despatx. Moltes gràcies també a tot el personal que ha passat pel Grup de Recerca en Microbiologia Aplicada i Mediambiental del Departament de Sanitat i Anatomia Animals de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona per les seves idees i propostes, per la cessió de material i equipament i per l'oportunitat de viure l'experiència d'estar al laboratori. En Leo Arosemena, qui va ser el primer en introduir-me al funcionament real d'un laboratori de microbiologia, es mereix un agraïment especial pel seu optimisme, disposició a l'hora de treballar i per esforçar-se cada dia per crear un bon ambient de treball al laboratori.

A la Dra. Eva Castells i la Dra. Bibiana Juan, per les converses sobre volàtils i per posar-me en contacte amb el Dr. Joan Gallardo, qui ha esdevingut un gurú de l'espectrometria de masses, els aromes, les begudes fermentades i un temorós custodi d'un *Torulopsis kefir* emancipat.

A l'Alfons i en Dídac, motors de l'Associació *Dogs & Jobs for Conservation and Support*, per la seva confiança al llarg d'aquests anys i per la seva col·laboració desinteressada amb aquest projecte.

Com és tradició en uns agraïments, toca anomenar el llistat d'amics que m'han empipat en major o menor mesura al llarg d'aquests tres anys insistint en veure'ns i compartir àpats: Núria, Rut, Cleo, Sílvia, Roc, Marta, Gerard, Anna, Sergi, Jordi, Esther, Xisco, Marta (i la mongeta), Allan, Berta, Noemi, Emilio, Eva i Manel. Us confesso que a tots, al llarg del temps, us he agafat cert apreci.

Han sigut molts els companys de feina que s'han convertit en amics al llarg d'aquests anys de donar tombs per diverses empreses, i a tots els hi desitjo el millor futur professional i personal possible. De tots ells, na Bàrbara, na Núria i na Mireia destaquen per la seva vocació i professionalitat.

Finalment, agraeixo tots els esforços que ha realitzat la meva família, especialment a en David per la seva paciència infinita, per obligar-me a aixecar els ulls de l'ordinador cada tres quarts d'hora, per no escoltar-me massa i no donar-me la raó quan no la tinc, per ser-hi cada dia i per recolzar-me en els moments més estrambòtics de la nostra relació. Na Cristina i en Jordi, per acollir-me a casa seva i ser al meu costat tant si els necessito com si no. En Pere i na Dolors, que ja no tenen clar si sóc un fill o un gendre.

Per acabar, i deixant-los especialment al final per poder-los donar una menció especial, als meus pares en Bibi i na Joana. Sou unes persones extremadament complexes, intrusives i no us agrada escoltar, però sempre us agrairé que hagueu respectat les meves decisions, per estrambòtiques que us hagin pogut semblar. Sense vosaltres no hauria arribat fins aquí.

A tots vosaltres, gràcies.

ABREVIACIONS

- **a_w**. Activitat d'aigua.
- **APPCC**. Anàlisi de Perills i Punts de Control Crítics.
- **ASab**. Medi de cultiu Agar Sabouraud sense antibiòtic.
- **ASab+**. Medi de cultiu Agar Sabouraud amb antibiòtic
- **BP**. Medi de cultiu Baird-Parker.
- **cAMP**. Adenosina monofosfat cíclica.
- **cont.**: Continuació.
- **EI**. Ionització elèctrica.
- **FAO**. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*.
- **GC**. Cromatografia de gasos.
- **HHA**. Eix Hipotalàmic-Hipofisiari-Adrenal.
- **HPLC**. Cromatografia líquida d'alta resolució.
- **HR**. Resposta d'hipersensibilitat.
- **ISR**. Resistència sistèmica induïda.
- **LMR**. Límit màxim de residus.
- **MC**. Microescleroci.
- **MK**. Medi de cultiu Agar McConkey.
- **MS**. Espectròmetre de masses.
- **M⁺**. Radicals catiónics.
- **NT**. Neurotransmissor.
- **OMS**. Organització Mundial de la Salut.
- **ONU**. Organització de les Nacions Unides.
- **PCR**. Reacció en cadena de la polimerasa.
- **PDA**. Medi de cultiu Patata-dextrosa agar.
- **p. ex.** Per exemple.
- **PIF**. Producció integrada de fruita.

- **ppm.** Parts per milió.
- **rpm.** Revolucions per minut.
- **SAR.** Resistència sistèmica adquirida.
- **SNA.** Sistema nerviós autònom.
- **SNAS.** Sistema nerviós autònom simpàtic.
- **SNAP.** Sistema nerviós autònom parasimpàtic.
- **SNC.** Sistema nerviós central.
- **SNP.** Sistema nerviós perifèric.
- **SNS.** Sistema nerviós somàtic.
- **SPME.** Microextracció en fase sòlida
- **TSA.** Medi de cultiu Triptona – Soja – Agar.
- **UC.** Unitat canina.
- **UFC.** Unitats formadores de colònies.
- **VOC.** Compost orgànic volàtil
- **vs.** *Versus.*

RESUM

L'ús d'unitats canines de treball (UC) per detectar la presència de microorganismes és una especialitat recent dins l'àmbit de les unitats canines de detecció i de seguretat. Una de les principals eines per a l'ensinistrament d'un gos en aquesta especialitat és una font d'olor que provingui del microorganisme que es pretén detectar.

Durant la realització d'aquesta tesi doctoral s'ha establert, seguint les pautes del mètode científic, un protocol estàndard de producció de mostres oloroses de fongs i treballant amb diferents microorganismes model. Les tècniques que s'han fet servir, basades en publicacions científiques i mètodes desenvolupats anteriorment, permeten obtenir una solució final que conté la major quantitat possible de components olorosos alhora que esdevé innòcua tant pel gos com per l'instructor o ensinistrador.

Un cop definit el mètode d'obtenció de les mostres i aprofitant les característiques dels microorganismes models, es desenvolupa un programa de treball de camp per determinar si aquests fongs poden ser detectats per gossos degudament ensinistrats i quin és el seu llindar de detecció.

Finalment, es determina la viabilitat de la implantació de les diferents UC de biodetecció en diferents àmbits del sector agrari per tal de contribuir a una producció agrícola més sostenible i ecològica.

ABSTRACT

The use of canine units to detect the presence of environmental microorganisms is a recent speciality within the field of security working dogs. One of the main tools to train a dog in this specialization is an odour sample from the target microorganism.

During the realization of this Thesis a standard protocol for production of odorous samples of fungi has been established, following the guidelines of the scientific method. Techniques that have been used, based on scientific publications, allow to obtain a final solution containing the maximum amount of odorous components while is harmless for the dog and their handler.

Once the method for obtaining the odorous samples has been defined, and taking advantage of the characteristics of microorganisms models, a practice working program has been developed to determine if these fungi can be detected by dogs properly trained and which is their detection threshold.

Finally, the feasibility of implementing this Canine Units in the agricultural sector has been studied to contribute to a more sustainable and ecological primary production.

SUMARI

INTRODUCCIÓ

INTRODUCCIÓ I JUSTIFICACIÓ DE LA INVESTIGACIÓ	9
MICOLOGIA	9
Micologia i indústria alimentària	10
Fongs, agricultura i producció ecològica.....	12
Patogenicitat dels fongs en animals.....	13
Compostos orgànics volàtils i metabolisme dels fongs.....	15
<i>Penicillium rugulosum</i>	17
<i>Penicillium rugulosum</i> com a agent indicador de contaminació en post-collita	19
Antecedents	19
Solucions actuals	21
<i>Trichoderma viride</i>	24
<i>Trichoderma viride</i> com a agent biofertilitzant i fitoestimulant del sòl.....	25
Antecedents	25
Solucions actuals	30
<i>Verticillium dahliae</i>	31
<i>Verticillium dahliae</i> com a agent fitopatogen de l'olivera en pre-collita	33
Antecedents	33
Solucions actuals	35
OLFACTE CANÍ	36
Anatomia i Fisiologia.....	36
Òrgan Vomeronasal i Feromones	41
NEUROPSICOLOGIA: CONTROL DE LA CONDUCTA	42
Sistema nerviós perifèric: efectes destacats sobre la conducta.....	43

Sistema nerviós central: efectes destacats sobre la conducta	44
Sistema límbic.....	44
Còrtex cerebral	45
Sistema límbic <i>vs</i> còrtex cerebral (emoció <i>vs</i> cognició).....	46
Neurotransmissors i conducta	47
Hormones i conducta.....	48
REVISIÓ BIBLIOGRÀFICA REFERENT A L'ÚS DE L'OLFACTE CANÍ COM A MÈTODE DE DETECCIÓ	49
Revisió bibliogràfica referent als mètodes existents de producció de mostres oloroses de fongs i mètodes d'ensinistrament.....	51
MÈTODES DE SEPARACIÓ I ANÀLISI QUÍMICA.....	52
Determinació de VOCs mitjançant SPME-GC-MS.....	54

OBJECTIUS I PLA DE TREBALL

OBJECTIUS	59
PLA DE TREBALL	60

MATERIALS I MÈTODES

ASSAJOS PREVIS.....	65
Cultiu i conservació <i>in vitro</i> de <i>Penicillium rugulosum</i> , <i>Trichoderma viride</i> i <i>Verticillium dabliae</i>	67
Tractaments físics aplicats a diferents soques de <i>Penicillium rugulosum</i> i <i>Trichoderma viride</i>	68
Obtenció de les suspensions de conidis.....	69
Xoc osmòtic.....	69
Ultrasons	69
Xoc tèrmic.....	70
Disseny experimental	70

Cultiu en Eppendorf amb filtre per separació de DNA i en flascons de vidre.....	71
Extracció de compostos orgànics volàtils en fase aquosa	71
ANÀLISI I SEPARACIÓ QUÍMICA DE COMPOSTOS ORGÀNICS	
VOLÀTILS.....	72
Preparació del patró intern	72
Preparació de les mostres.....	72
Adsorció dels VOCS amb fibra SPME (<i>headspace</i>), separació per cromatografia i detecció amb espectròmetre de masses	73
Anàlisi dels compostos detectats amb l'espectròmetre de masses	74
SELECCIÓ DEL GOS DE TREBALL.....	75
Criteris de selecció del gos de treball	75
Material per la selecció.....	75
Entorn de treball durant la selecció.....	76
Proves a realitzar durant la selecció.....	77
ENSINISTRAMENT BÀSIC I ESPECÍFIC	80
Material necessari per l'ensinistrament	80
Entorn de treball durant l'ensinistrament.....	81
Metodologia de treball.....	81
Planificació de l'ensinistrament.....	82
Cronograma	82
Mètodes d'avaluació del progrés.....	85
ASSAIG FORMAL DELS GOSSOS ENSINISTRATS I ANÀLISI	
ESTADÍSTIC	85
PROCEDIMENTS DE PRECAUCIÓ I SEGURETAT.....	86
Recomptes de la microbiota de la mucosa nasal	87
Determinació de l'evolució dels patrons radiogràfics toràcics.....	87

RESULTATS

ASSAJOS PREVIS.....	91
Cultiu i conservació in vitro de <i>Penicillium rugulosum</i> , <i>Trichoderma viride</i> i <i>Verticillium dahliae</i>	91
Tractaments físics aplicats a diferents soques de <i>Penicillium rugulosum</i> i <i>Trichoderma viride</i>	91
Cultiu en Eppendorf amb filtre per separació de DNA i en flascons de vidre.....	94
Extracció de compostos orgànics volàtils en fase aquosa	94
ANÀLISI I SEPARACIÓ QUÍMICA DE COMPOSTOS ORGÀNICS	
VOLÀTILS.....	94
Blancs	94
<i>Penicillium rugulosum</i>	95
<i>Trichoderma viride</i>	96
<i>Verticillium dahliae</i>	96
SELECCIÓ I ENSINISTRAMENT DEL GOS DE TREBALL	109
ASSAIG FORMAL DELS GOSSOS ENSINISTRATS I ANÀLISI	
ESTADÍSTIC	110
PROCEDIMENTS DE PRECAUCIÓ I SEGURETAT.....	112
Recomptes de la microbiota de la mucosa nasal	112
Determinació de l'evolució dels patrons radiogràfics toràcics.....	112

DISCUSSIÓ

ASSAJOS PREVIS.....	117
Tractaments físics aplicats a diferents soques de <i>Penicillium rugulosum</i> i <i>Trichoderma viride</i>	117
Cultiu en Eppendorf amb filtre per separació de DNA i en flascons de vidre....	118
Extracció de compostos orgànics volàtils en fase aquosa	119

ANÀLISI I SEPARACIÓ QUÍMICA DE COMPOSTOS ORGÀNICS VOLÀTILS.....	121
DETECCIÓ DE MICROORGANISMES AMB UNITATS CANINES	123
Unitat canina per la detecció de <i>Penicillium rugulosum</i>	124
Unitat canina per la detecció de <i>Trichoderma viride</i>	128
Unitat canina per la detecció de <i>Verticillium dahliae</i>	130
Detecció d'altres microorganismes.....	133
PROCEDIMENTS DE PRECAUCIÓ I SEGURETAT.....	135
 CONCLUSIONS	 141
 BIBLIOGRAFIA	 143
WEBGRAFIA.....	153
ANNEXES.....	155

INTRODUCCIÓ

INTRODUCCIÓ I JUSTIFICACIÓ DE LA INVESTIGACIÓ

La present tesi planteja les pautes per obtenir un protocol genèric per a l'obtenció de mostres oloroses d'origen fúngic per a la instrucció d'UC de biodetecció, pel que es requereixen varis estudis previs que permetin definir la millor metodologia de treball. Posteriorment, i degut a la necessitat de confirmar l'efectivitat dels productes finals, s'apliquen programes d'ensinistrament específic que permeten determinar si, tal i com s'espera, les mostres són detectables pels gossos i extrapolables a l'olor de les soques salvatges. Per tal de crear un context d'aplicació comú, els diferents microorganismes amb els que es treballa al llarg de la investigació estan relacionats amb diferents processos de la producció agrícola.

Els principals temes a tractar en aquesta introducció són: una introducció a la micologia, la relació actual entre els fongs, la producció d'aliments i l'agricultura, unes bases teòriques sobre l'olfacte caní i la neuropsicologia de la conducta, els antecedents de l'ús dels gossos com a mètode de detecció i els fonaments de les tècniques de separació i anàlisi químic.

MICOLOGIA

Els fongs són organismes eucariotes, no fotosintètics (no posseeixen plastidis), unicel·lulars o pluricel·lulars, que es caracteritzen pel fet de posseir parets cel·lulars rígides i de composició variable. Són organismes heteròtrofs i, degut a la seva paret rígida, no són capaços de nodrir-se de microorganismes més petits.

La majoria de fongs viuen lliures a la terra o a l'aigua i obtenen la seva energia per respiració o fermentació de materials orgànics solubles presents en aquests

ambients. En funció de com aconseguen la matèria orgànica que necessiten es poden classificar en:

- Fongs paràsits. Tant de plantes com d'animals, causant micosis. A mode d'exemple, algunes patologies causades per fongs paràsits són les tinyes, l'ergotisme i la candidiasi.
- Fongs sapròfits. Ocupen el nivell tròfic de descomponedors en els ecosistemes i són els responsables de la mineralització dels bioelements. Els fongs sapròfits s'alimenten de matèria morta i el procés de nutrició el porten a terme alliberant enzims que lisen les substàncies nutritives del seu entorn, absorbint posteriorment els productes resultants. Els fongs sapròfits poden actuar com a indicadors de que les condicions ambientals són favorables pel creixement d'altres tipus de fongs.
- Fongs simbiòtics. Amb les algues poden formar líquens, amb algunes arrels de plantes formen micorrizes. Els fongs simbiòtics es poden fer servir com a biofertilitzants i fitoestimulants per l'agricultura.

Micologia i indústria alimentària

Els fongs (inclosos els llevats) són importants en diferents sectors industrials, entre els que destaca la indústria alimentària. Les diferents accions que poden desenvolupar els fongs dins aquest sector seran desenvolupats al llarg d'aquesta introducció i es poden classificar en:

- Acció deteriorant. Deteriorament del producte final (per exemple, desenvolupament de llim superficial en el producte comercial) i de les instal·lacions (per exemple, desenvolupament de biofilms o de bio-corrosió). Els fongs del gènere *Penicillium* destaquen com a agents deterioradors i, tal i com s'explicarà posteriorment, *Penicillium rugulosum* actua com a fong

indicador de que les condicions ambientals afavoreixen el creixement d'altres fongs.

- Acció patògena. Sobre l'organisme productori (fongs fitopatògens i fongs causants de micosis en animals de producció) o fongs causants de malalties de transmissió alimentària als humans i animals de renda (micotoxicosis). Com a microorganisme fitopatogen, en aquest treball s'ha estudiat *Verticillium dahliae*.
- Fongs d'ús industrial. Són fongs filamentosos i llevats utilitzats per la producció i conservació d'aliments, i es poden diferenciar vàries activitats:
 - o Llevats utilitzats en la producció de biomassa. Actualment només existeixen tres llevats autoritzats pel consum humà directe: *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces fragilis* i *Candida utilis*.
 - o Fongs productors de metabòlits d'ús industrial. Alguns exemples són: *Mucor miehei* per produir quall microbià, *Aspergillus niger* modificat genèticament per produir quimosina biotecnològica, glucoxidasa, catalasa i cel·lulasa, *Aspergillus oryzae* per produir pectinasa, entre d'altres.
 - o Fongs utilitzats en la transformació i conservació d'aliments. Existeixen molts aliments que durant el seu processament són transformats per l'activitat fúngica. En general, es poden dividir en: (1) productes lactis i derivats (cultius *starters* per la producció de formatges, per exemple *Penicillium roqueforti*, *Penicillium camemberti*, *Penicillium album* i *Penicillium glaucum*; *Saccharomyces kefir* i *Torulopsis kefir* per elaborar kèfir; *Kluyveromyces lactis* per fermentar el Kumis), (2) productes d'origen vegetal (*Candida versatilis* i *Candida etchellsii* per elaborar moromi; *Saccharomyces rouxii* per fermentar el miso; *Rhizopus oligosporus* pel tempeh tradicional; *Pichia fermentans* i *Schizosaccharomyces pombe* per fermentar els grans de cacau; *Saccharomyces cerevisiae* per elaborar pa) i (3) productes alcohòlics (*S. cerevisiae* per produir vi, cervesa i sake).

- Fongs utilitzats per la millora de la producció agrícola. Destaquen els fongs entomopatògens, utilitzats per combatre plagues d'insectes (per exemple, *Beauveria bassiana* aplicada com a agent de biocontrol de *Rhynchophorus ferrugineus*) i els fongs biofertilitzants i fitoestimulants com *Trichoderma viride*, estudiat en aquesta tesi.

Fongs, agricultura i producció ecològica

Per mantenir la població mundial prevista per l'ONU per l'any 2030 la producció agrícola haurà d'augmentar en un 100%. Les possibles estratègies per augmentar la producció són: (1) mantenir i augmentar la producció en els cultius, (2) introduir varietats d'elevat rendiment, (3) millorar el control dels agents nocius i (4) augmentar el consum de fertilitzants.

D'altra banda, la FAO defensa una forma d'agricultura més sostenible perquè preveu que els sistemes de producció i les polítiques i institucions que sustenten la seguretat alimentària mundial són cada cop més insuficients. L'agricultura sostenible ha de garantir la seguretat alimentària mundial i al mateix temps promoure ecosistemes saludables i recolzar la gestió sostenible del terra, l'aigua i els recursos naturals. Per ser sostenible, l'agricultura ha de satisfer les necessitats de les generacions presents i futures dels seus productes i serveis, garantint al mateix temps la rendibilitat, la salut del medi ambient i l'equitat social i econòmica.

Per aconseguir la transició global a l'alimentació i agricultura sostenible, és imprescindible millorar la protecció ambiental, la resiliència dels sistemes i l'eficiència en l'ús dels recursos. La micologia aplicada a la indústria alimentària i a altres sectors pot contribuir notablement a la millora de la producció i transformació dels recursos alimentaris.

Així, com a exemple d'aplicació de l'ús dels fongs a la producció agrícola ecològica, un bon sistema de producció integrada inclouria: ús de fongs biofertilitzants

i fitoestimulants per augmentar la producció, ús de fongs fitopatògens com a agents de biocontrol de plagues, estudi de la presència de fongs indicadors de contaminació durant l'emmagatzematge del producte final en post-collita i ús de fongs descomponedors de matèria orgànica en sistemes de digestió aeròbica d'aigües residuals per millorar l'ús dels recursos hídrics (per exemple, *Trichosporum cutaneum* degut a la seva capacitat d'oxidació de compostos orgànics, inclosos alguns composts tòxics per altres fongs com els derivats fenòlics).

Patogenicitat dels fongs en animals

Per la majoria de microorganismes, un dels medis més hostils és l'aire o atmosfera. Suspesos a l'aire, degut a la seva mida, els microorganismes són molt sensibles a la dessecació, als efectes perjudicials de l'energia solar i a l'activitat química de l'oxigen en estat gasós. Degut a aquests factors, no existeix una microbiota natural o normal de l'aire, ja que els microorganismes no s'hi multipliquen.

Ara bé, els conidis dels fongs utilitzen l'atmosfera per distribuir-se pel medi i són el tipus de microorganismes més freqüent a l'aire. Per exemple, l'aire de les zones agrícoles conté una mitja de 10^4 conidis de fong per m^2 d'aire, arribant a $10^8 - 10^9$ conidis/ m^2 durant l'època d'operacions agrícoles. Aquest fet fa que el control dels fongs a l'ambient sigui extremadament complex i que, amb freqüència, es produeixin patologies relacionades amb el seu contacte de forma reiterada. Els fongs en contacte amb l'home o amb els animals poden desencadenar fonamentalment tres tipus de processos:

- Micosis. Implica el desenvolupament de la soca fúngica a l'organisme. És una infecció que pot arribar a ser molt greu i, depenent de la zona afectada, es parla de tnyes o dermatomicosis (afectació cutània) o de micosis sistèmica o profunda. Les dermatomicosis tendeixen a ser localitzades en animals sans i generalitzades en animals immunodeprimits (Figura 1). El sistema respiratori

és el més afectat per les micosis sistèmiques, el que és especialment important quan es treballa amb gossos que han de localitzar aquests fongs mitjançant l'olfacte. Les micosis sistèmiques sovint són de localització pulmonar o intranasal. Les rinitis micòtiques produeixen lesions inflamatòries granulomatoses cròniques amb destrucció del teixit ossi, i sovint són causades per diferents espècies dels gèneres *Aspergillus* o *Penicillium*. La pneumònia micòtica es caracteritza per l'aparició de granulomes de marges irregulars i sòlids de distribució variable (Figura 2). Un altre punt important de les micosis, és que poden transmetre's entre animals i que poden ser malalties zoonòtiques.



Figura 1. Dermatòmicosi localitzada (esquerra) i generalitzada (dreta) en gos. (Font: Juan Rejas López, 2004, Universidad de León).

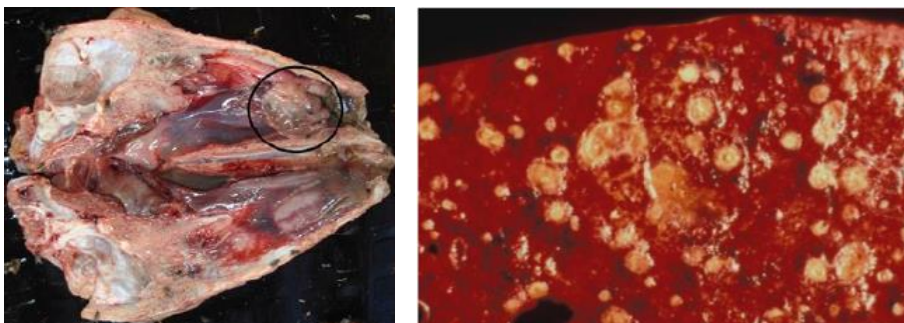


Figura 2. Lesions macroscòpiques d'una rinitis micòtica (esquerra) i d'una pneumònia micòtica (dreta). (Font: Universitat Autònoma de Barcelona).

- Micotoxicosis. Implica el consum de productes que continguin les toxines fúngiques. La majoria de micotoxicosis es produeixen pel consum d'aliments contaminats, i els efectes tendeixen a aparèixer a llarg termini i són greus. Cada espècie o gènere de fong toxigènic produeix unes micotoxines característiques, i cada una afecta un òrgan diana, pel que la simptomatologia és força complexa i sovint difícil de diagnosticar. Quan a la prevenció, actualment es basa en realitzar determinacions de micotoxines en aliments.
- Hipersensibilitat o al·lèrgia. Implica el contacte amb els fongs o els seus components de forma reiterada. Es poden produir reaccions d'hipersensibilitat tipus I i tipus III. En la tipus I (mediada per IgE) la simptomatologia procedeix de la desgranulació dels mastòcits i de l'alliberació d'histamina i es manifesta com una disminució de la pressió sanguínia, vasoconstricció, broncoconstricció i augment de les secrecions mucoses. En la tipus III (mediada per IgG o IgM) es produeix una formació d'immuno-complexes que activen el sistema immunitari en cascada manifestant-se típicament amb simptomatologia pulmonar.

Compostos orgànics volàtils i metabolisme dels fongs

Els metabòlits secundaris són petites molècules que, a diferència dels metabòlits primaris, no estan directament relacionats amb el creixement i desenvolupament del fong, sinó que es produeixen en determinats estadis del creixement o sota circumstàncies molt concretes.

Els microorganismes són capaços de produir una gran varietat de metabòlits secundaris, entre els que destaquen els compostos orgànics volàtils (VOC) que en moltes ocasions no es detecten per falta de mètodes estandarditzats. Moltes d'aquestes petites molècules, la majoria amb un pes molecular inferior a 300 DA, presenten un punt d'ebullició baix i un perfil lipòfil, el que els hi confereix característiques volàtils

(Lemfack *et al.*, 2013). Els VOC són elaborats per diversos gèneres de fongs i bacteris i poden detectar-se perfils específics en gèneres de microorganismes concrets, el que permetria identificar-los i, en cas de disposar d'un mètode de detecció, localitzar-los a l'ambient (Filipiak *et al.*, 2012). En tot cas, la detecció del VOCS a l'ambient és indicativa de la presència de microorganismes actius (Wady *et al.*, 2003; Lavine *et al.*, 2012), però no morts o inhibits.

S'ha descrit que els fongs poden produir una gran varietat de VOCs, entre els que s'hi troben alcohols, cetones, terpens, èsters i compostos de sofre (Kuske, 2005). La composició dels compostos volàtils produïts depèn del substrat de creixement i de les condicions ambientals però, en tot cas, no varia el perfil de compostos sinó la concentració relativa de cada un d'ells. Cada espècie té el seu perfil de VOCs, i el cultiu en diferents substrats canvia el nombre i concentració d'aquests compostos. Aquest fet fa que no es pugui determinar una relació “un VOC – un fong”, sinó que la identificació s'ha de basar en un perfil olorós resultat de la composició de diferents VOCs a concentració variable (Figura 3).

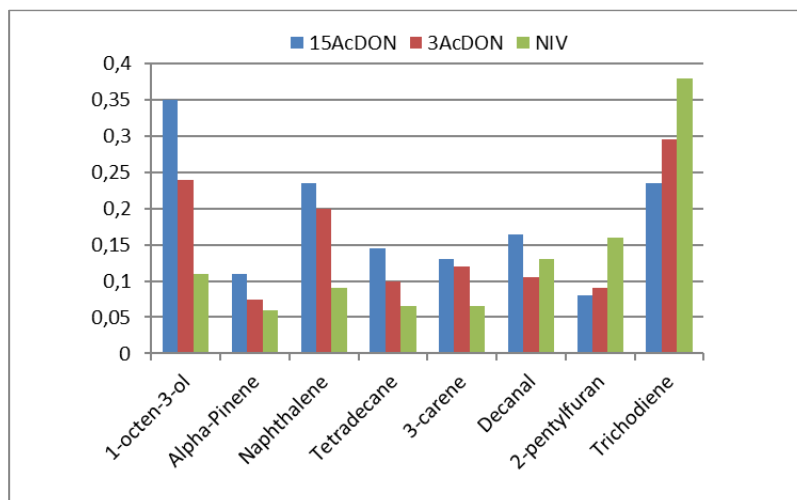


Figura 3. Perfil quantitatiu dels principals VOCs emesos per tres soques de *Fusarium graminearum* (15AcDON, 3AcDON, NIV) en unitats relatives (RU) (Adaptat de Busko, M. *et al.*, 2014).

La màxima producció de VOCs s'associa al metabolisme secundari dels fongs, especialment la producció de terpens i sesquiterpens, i té lloc just abans i durant l'esperulació i la producció de micotoxines.

El mètode convencional de detecció i anàlisi del perfil de VOCs d'un fong és mitjançant una separació amb cromatografia de gasos i detecció amb espectròmetre de masses. Aquest sistema permet detectar la majoria de compostos (per exemple, 2-metil-1-propanol, dimetil disulfid, etc.) però d'altres sovint no són detectats (per exemple, la geosmina i el 2-metilisoborneol). L'anàlisi amb GC-MS és molt sensible i específic, però requereix material de laboratori molt concret i d'elevat cost.

Com a mètode de detecció més econòmic de VOCs s'han desenvolupat detectors electrònics capaços de classificar gèneres de fongs (*Penicillium*, *Cladosporium*, *Stachybotrys* i *Aspergillus*, entre d'altres) mitjançant un anàlisi dels VOC que emeten els cultius (Gibson *et al.*, 1997). Finalment, com a sistema de detecció alternatiu als detectors electrònics existeix la possibilitat de fer servir Unitats Canines (UC) de biodetecció de microorganismes. Aquests tipus de gossos, ensinistrats per detectar, localitzar i senyalar la presència de gèneres i/o espècies concretes de fongs, suposen un mètode ràpid, econòmic i novell de *screening* d'entorns i substrats susceptibles d'estar contaminats. Actualment aquestes UC s'estan fent servir amb èxit per la detecció de fongs deterioradors d'edificis (*Serpula lacrymans*, *Coniophora puteana*, *Antrodia sinuosa*) i existeix la possibilitat d'ampliar el seu ús en molts altres àmbits, especialment en l'àmbit agrari.

Penicillium rugulosum

El gènere *Penicillium* pertany al *Phylum Ascomycota*, Classe *Euascomycetes*, Ordre Eurotiales i Família *Trichocomaceae*. Dins el gènere *Penicillium* s'inclouen més de 300 espècies de fongs filamentosos (excepte *Penicillium marneffe*, que és termodimòrfic)

àmpliament distribuïts a la natura. Existeixen espècies patògenes i sapròfites, moltes productores de micotoxines.

Macroscòpicament el gènere *Penicillium* presenta un creixement relativament ràpid, formant colònies filamentosos, amb aspecte de vellut o de textura cotonosa. Les colònies inicialment són blanques i posteriorment viren a verd-blavós, gris-verdós, gris oliva, groc o rosades. El revers de la colònia és pàl·lid o groc. Microscòpicament, les espècies de *Penicillium* presenten hifes septades hialines amb conidiòfors simples o ramificats, mètules, fiàlids i conidis. Una característica típica d'aquest gènere és l'organització dels fiàlids a la punta dels conidiòfors, que presenta forma de pinzell (Thom, 1919) (Figura 4).

Penicillium rugulosum forma colònies amb aparença de vellut, de color groc verdós a verd fosc. Microscòpicament presenta uns conidiòfors de 70 – 100 μm , biverticil·lats, formant l'estructura típica del gènere *Penicillium*. Les mètules fan de 10 a 15 μm , els fiàlids de 8 a 10 μm i els conidis, de forma el·lipsoïdal, mesuren 3 – 3,5 x 2,5 – 3 μm (Figura 5). És un fong poc patogen, però pot produir úlceres corneals en individus immunosuprimits (Swietliczkowa *et al.*, 1984).

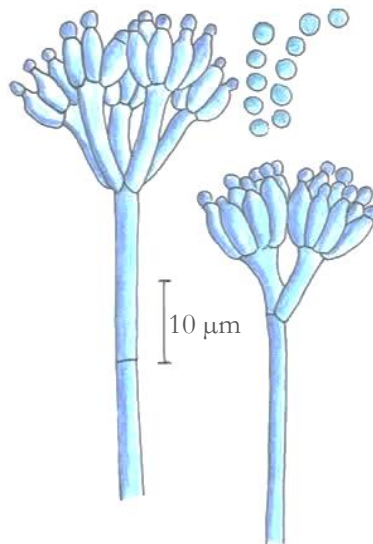


Figura 4. . Representació de l'organització típica amb forma de pinzell dels fiàlids del gènere *Penicillium*.

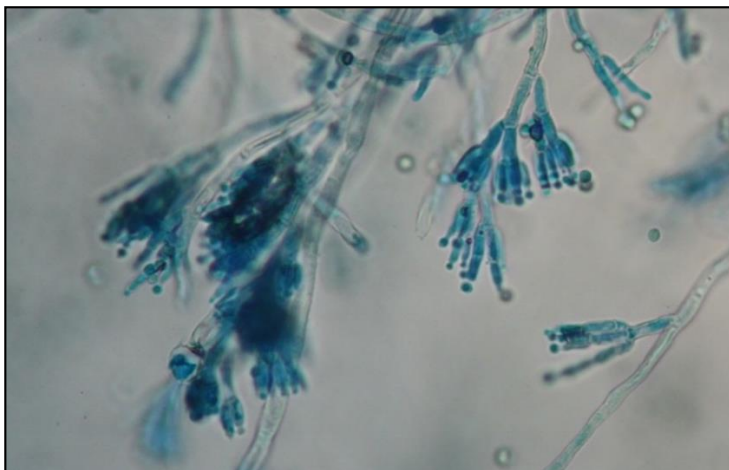


Figura 5. . Aspecte d'una soca de *Penicillium rugulosum* al microscopi òptic (x1000).

Penicillium rugulosum com a agent indicador de contaminació en post-collita

Antecedents

La qualitat d'un aliment, com pot ser una fruita o verdura, no és fàcil de mesurar i depèn de molts factors. Actualment es considera que el concepte de *qualitat total* és la suma de: (1) la qualitat tecnològica (aptitud per la conservació, sensibilitat a fisiopaties i podridures i resistència a la manipulació), (2) qualitat sensorial i (3) nutritiva, (4) qualitat sanitària (criteris higiènics i de protecció de la salut) i (5) qualitat comercial. L'alteració dels fruits en post-collita suposa una pèrdua dels cinc tipus de qualitat descrits anteriorment, i una pèrdua de qualitat es reflecteix en una disconformitat del consumidor, una devaluació del producte final i una pèrdua de la rendibilitat econòmica. Les alteracions més freqüents són: canvis en els propietats físiques, mecàniques, químiques i sensorials, cops i ferides, fisiopaties, presència de podridures o alteracions fúngiques i el creixement de fongs productors de micotoxines.

La microbiota inicial del fruit o vegetal depèn del terra, aigua, insectes, animals i tipus d'adob presents a l'ambient durant la seva producció, recollecció i emmagatzematge. El recompte total de microorganismes pot ser molt variat i elevat i sovint s'aïllen fongs miceliats (per exemple, *Fusarium spp*, *Alternaria spp*), llevats i bacteris (coliformes, corineformes, *Micrococcus spp* i *Pseudomonas spp*). La fruita, els vegetals i les hortalisses fresques tenen un pH àcid (habitualment de 4.5) degut a la presència d'àcids orgànics, juntament amb un elevat percentatge d'aigua, pectines, cel·lulosa, vitamines i sucres. Aquesta composició, rica en nutrients, afavoreix el creixement de bacteris àcid làctics, llevats i fongs miceliats provinents del camp, l'equipo de recollida o dels manipuladors dels aliments durant el període de post-collita. Quan es produeix creixement de fongs en els vegetals es diferencien dos tipus d'efectes:

- Fongs causants d'alteracions. Les alteracions que es produeixen en el producte fresc habitualment són degudes al creixement de microorganismes productors de podridures toves (estovament, ennegriment, pèrdua d'aigua i mala olor degut al creixement de *Rhizopus* i *Sclerotinia*, per exemple) i floridures (pel creixement de *Penicillium*, *Botrytis*, *Alternaria*, *Aspergillus* o *Fusarium*, entre d'altres).
- Fongs causants de patologies. Són fongs productors de micotoxines. Alguns exemples destacats són la producció d'ocratoxina A per *Aspergillus carbonarius* al raïm i la producció de patulina per *Penicillium expansum* a la poma. La patologia per *Penicillium expansum* és molt freqüent i provoca molts danys, ja que aquest presenta un creixement agressiu i es pot desenvolupar a baixes temperatures. Necessita una ferida per poder penetrar al fruit, i d'aquí que posteriorment es tractin temes de maneig global durant la collita i la post-collita. Un cop ha colonitzat el fruit, *Penicillium expansum* és capaç de produir patulina abans d'esporejar (és a dir, abans que es detecti macroscòpicament l'alteració).

Aquesta problemàtica no només afecta la producció de la matèria primera (verdures, hortalisses, fruites) sinó també l'elaboració de productes derivats. Així, per exemple, els suc, nèctars i melmelades suposen un excel·lent medi de cultiu pels fongs miceliats i els llevats si aquests aliments no es tracten amb calor. En aquests casos, els fongs alteradors poden créixer a la superfície del producte, en redueixen la qualitat i són un problema relatiu, ja que el principal factor de risc en aquests productes és la presència de micotoxines termoresistents com la patulina i l'ocratoxina A.

Tal i com indiquen Amiri *et al.*,(2005), *Penicillium rugulosum* s'ha trobat a la superfície de diferents tipus de fruits, tant en pre-collita com en post-collita, i a l'ambient de les càmeres d'emmagatzematge i refrigeració, essent també una de les primeres espècies en desenvolupar-se.

Solucions actuals

El control de les alteracions fúngiques i podridures en post-collita es basa en realitzar unes tècniques agronòmiques correctes, realitzar tractaments de desinfecció d'envasos i cambres (complir la normativa APPCC) i fer servir mètodes de conservació dels fruits. Els mètodes de control tradicional inclouen: (1) els tractaments pre-collita, (2) els tractaments post-collita, (3) el control del moment de collita en funció del climateri i (4) la refrigeració dels fruits.

Els tractaments fungicides pre-collita permeten el compliment dels terminis de seguretat dels residus degut al temps transcorregut entre l'aplicació i el consum del fruit. Els productes que més sovint s'apliquen són: Diclofluanida®, Metil-Tiofanat®, Imazalil®, Iprodiona®, Tiabendazol®, Procloraz® i Propiconazol®. Estan acceptats socialment i, tot i que alguns productes s'estan retirant del mercat, actualment existeix molta varietat de principis actius.

Els avantatges que presenten els tractaments pre-collita són: (1) gran efectivitat per conservacions curtes; (2) permeten reduir l'inòcul de patogen; (3) es disposa d'un nombre molt elevat de productes útils; (4) poc risc de superar els límits

màxims de residus (LMR) perquè el fungicida està exposat a condicions externes i s'elimina ràpidament.

Els tractaments en post-collita actualment són necessaris per la conservació a llarg termini i tenen un cost relativament baix, són d'aplicació senzilla i efectius. Així i tot, presenten determinats riscos o factors que fan que estiguin altament regulats: (1) un ús massiu i poc controlat en post-collita pot provocar un augment de residus, pel que s'han d'establir LMRs (Límits Màxims de Residus) per cada producte i per cada vegetal; (2) s'afavoreix la selecció de soques resistents; (3) si la finca és PIF (Producció Integrada de Fruita) no es poden realitzar tractaments post-collita.

El moment de la recol·lecció dels fruits o vegetals dependrà de l'ús que se n'hagi de fer posteriorment i de si són climatèrics o no climatèrics. Si s'han de conservar molt temps en refrigeració convé fer la recol·lecció quan encara no són madurs i posar-los en cambres amb un 1% d'oxigen per tal d'alentir-ne el metabolisme.

La intensitat respiratòria del fruit decreix després de la floració fins a arribar a un mínim climatèric que coincideix amb el moment de la recol·lecció per llarga conservació (Figura 6). Les fruites climatèriques intensifiquen molt la respiració un cop han madurat, i el màxim climatèric coincideix amb el moment òptim de qualitat sensorial i és el pas previ a la senescència. Per tant, els fruits climatèrics s'han de recol·lectar en el seu mínim climatèric, refrigerar en la pre-venta i, un cop a casa del consumidor arribaran al màxim climatèric i al punt òptim de qualitat sensorial. Alguns exemples de fruits climatèrics són: poma, albercoc, alvocat, plàtan, xirimoia, figues, mango, meló, papaia, préssec, pruna, caqui i síndria. Una recol·lecció en el moment inadequat pot provocar, per exemple, que el fruit arribi a la senescència durant l'emmagatzematge i que apareguin podridures de forma precoç.

El moment de la recol·lecció dels fruits no climatèrics es determina amb paràmetres morfològics, però és una tasca complicada perquè són canvis molt subtils. El moment òptim de recol·lecció sol ser quan s'ha produït el màxim creixement. Alguns exemples de fruits no climatèrics són: cirera, cogombre, raïm, llimona, pinya, mandarina, maduixa i taronja.

La refrigeració dels fruits consisteix en reduir la temperatura mantenint una humitat relativa alta i una circulació forçada de l'aire. La baixa temperatura permet reduir la respiració del fruit i el creixement de microorganismes; la humitat relativa elevada facilita una bona transpiració i manté la qualitat; la circulació d'aire homogeneïtza la temperatura de la cambra. La refrigeració dels fruits provoca:

- Alentiment de la respiració per reducció de la temperatura. Si es recol·lecten en el mínim climatèric només hauran de madurar i ja no hauran d'augmentar més de mida. Amb la conservació en fred es retarda l'entrada al climateri i, per tant, s'allarga la conservació.
- Si a més de reduir la temperatura es redueix la concentració d'oxigen, s'allarga molt més el climateri per reducció de la respiració i per reducció de la concentració d'etilè a la cambra (molècula que té un mecanisme d'acció semblant a una hormona vegetal que catalitza un augment de la respiració). Per reduir la concentració d'oxigen a un 2-3% s'augmenta el diòxid de carboni al 5%.

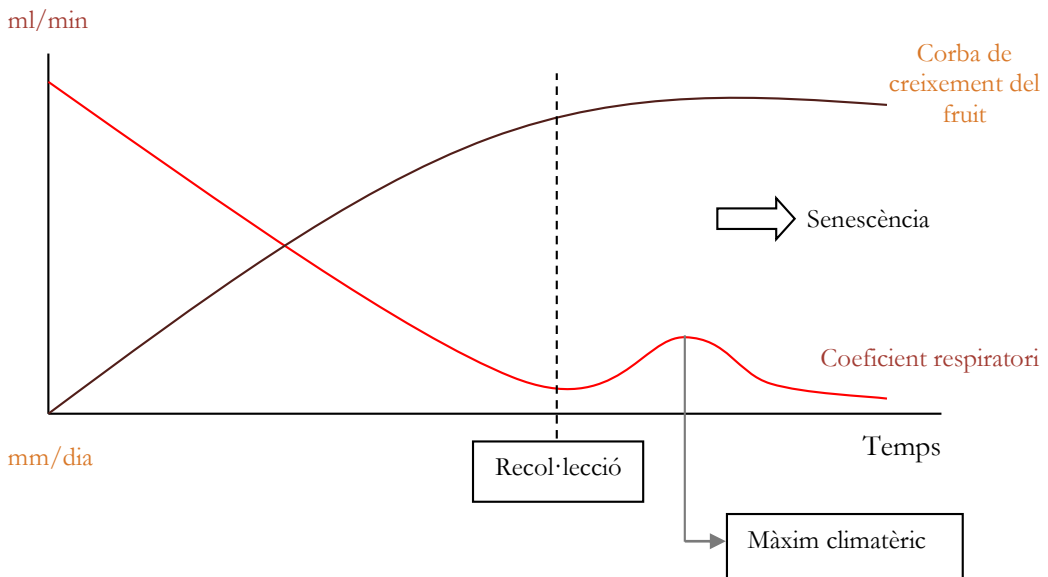


Figura 6. Representació de la corba de creixement i respiració dels fruits climatèrics, amb indicacions del punt òptim de recol·lecció i l'arribada a la senescència.

Finalment, cal destacar que existeixen noves línies d'investigació en els mètodes de control post-collita que no es tractaran en aquesta tesi, però entre els que destaquen: l'ús de MCHP, olis essencials de plantes, pèptids antimicrobians i l'aplicació de tractaments físics.

Trichoderma viride

El gènere *Trichoderma* pertany a la Divisió *Mycota*, Subdivisió *Eumycota*, Classe *Hyphomycetes*, Ordre *Moniliales* i Família *Moniliaceae*. Les espècies del gènere *Trichoderma* es troben a tot tipus de sòls, són sapròfites i sovint també actuen com a simbionts oportunistes de plantes perquè poden desenvolupar relacions endofíiques de mutualisme amb una gran varietat d'espècies vegetals.

Macroscòpicament les colònies del *Trichoderma viride* tendeixen a tenir un color blanc inicial que vira a verd fosc o groc quan es produeix l'esperulació. Microscòpicament presenta un miceli fi i pelat, amb els conidiòfors formant estructures ramificades semblants a petits arbres (Figura 7 i 8) (Rifai, 1969).

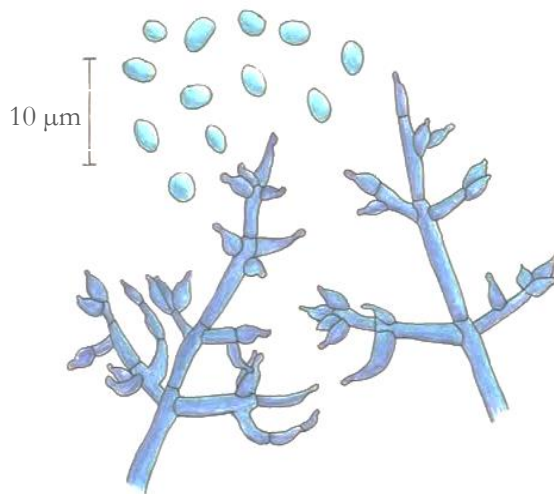


Figura 7. . Representació de l'aspecte microscòpic del gènere *Trichoderma*.

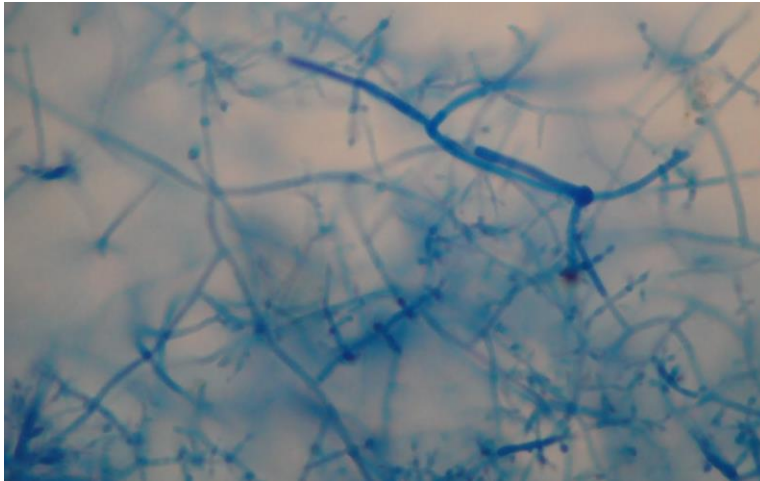


Figura 8. . Imatge al microscopi òptic d'una soca de *Trichoderma viride* (x1000).

Trichoderma viride com a agent biofertilitzant i fitoestimulant del sòl

Antecedents

Els productes no biotecnològics que es fan servir per augmentar la productivitat dels camps són els fertilitzants químics (nitrogen, fòsfor i potassi). Per cada kg de fertilitzants aportats, la producció de cereals augmenta 10 kg. Les varietats de cereals d'elevat rendiment requereixen una gran aportació de N, P i K, com per exemple: el blat de moro requereix 250 kg de nitrogen/ha per obtenir 20-25 T de gra/ha i el blat necessita una aportació de 120 Kg de nitrogen/ha per obtenir 6-7 T de gra/ha.

Els principals elements que limiten el creixement vegetal i que s'ha d'aportar d'alguna forma al sòl són:

- Nitrogen (amoni, nitrat). La demanda és molt elevada en els cultius, aproximadament de 100-200 Kg per hectàrea. L'aportació de nitrogen augmenta els costos de producció i s'hauria d'aprofitar que les lleguminoses tenen capacitat de fixar nitrogen (50% del nitrogen fixat és d'origen biològic).
- Fòsfor. Es requereixen entre 1 i 35 kg/ha, i actualment cal poca aportació perquè se n'ha fet servir durant molt temps.
- Potassi. Se'n requereix entre 40 i 170 kg/ha i és un mineral necessari per la fotosíntesi, activitat enzimàtica, absorció d'aigua i regulació osmòtica. La seva aportació depèn molt del tipus de sòl i de la seva disponibilitat, ja que en sòls argilosos es reté molt però les plantes no el poden agafar bé, mentre que en sòls arenosos es filtra cap al freàtic i no està disponible.

Els principals efectes dels fertilitzants químics que fan que el seu ús estigui regulat i limitat són: (1) el seu ús és ineficient perquè, per exemple, només el 50% del nitrogen aplicat és absorbit pels cultius; (2) s'acumulen al sòl i (3) el seu rentat contamina les aigües freàtiques; (4) es desnitrifiquen convertint-se en nitrats, el que contribueix a l'alteració de la capa d'ozó (el 90% del procés de desnitrificació produeix nitrogen gasós). La Unió Europea està regulant en la Política Agrícola Comú l'ús dels fertilitzants químics i proposa una agricultura sostenible amb una reducció de l'ús d'aquests productes.

Els principals productes biotecnològics que es poden fer servir per augmentar la producció als camps són inòculs microbiològics que es poden aplicar tant com a agents de biocontrol com a agents nutritius (biofertilitzants i fitoestimulants). Els principals avantatges que ofereixen els microorganismes biofertilitzants i fitoestimulants són: (1) substitueixen els fertilitzants químics; (2) milloren l'ús de l'aigua; (3) disminueixen els costos de producció; (4) es redueix la contaminació ambiental; (5) millora el rendiment de la producció; (6) en condicions òptimes, es poden multiplicar per sí mateixos; (7) no tenen efecte tòxic o és molt baix sobre

microorganismes no diana. Els agents de biocontrol, biofertilitzants i fitoestimulants que majoritàriament es fan servir actualment són:

- Microorganismes fixadors de nitrogen. Són organismes simbiotes de les arrels de les plantes que aporten nitrogen i actuen formant rizobis, actuant com a biofertilitzants. Poden ser organismes simbiotes (espècie-específics), com el cas de *Rhizobium* en lleguminoses, els Actinomicets en arbres i els Cianobacteris en falgueres, o microorganismes fixadors de nitrogen inespecífics, com *Azospirillum* i *Bradyrhizobium*.
- Micorrizes: bacteris millorants de l'absorció de nutrients. Són bacteris estretament connectats a les arrels de les plantes, poc específics i que actuen com a biofertilitzants i fitoestimulants. Es poden associar com a ectomicorrizes (Basidiomicets que no penetren l'arrel de la planta, les seves hifes colonitzen l'espai intercel·lular dels teixits externs) o com a endomicorrizes (Zigomicets que actuen com a simbiotes obligats inespecífics colonitzant les cèl·lules de l'arrel augmentant la superfície radicular).
- Rizobacteris promotors del creixement de les plantes. Són bacteris que habiten la rizosfera i que estimulen significativament el creixement de les plantes. Colonitzen la superfície de l'arrel de la planta i produeixen precursors i anàlegs de fitohormones, compostos que solubilitzen nutrients, metabòlits que estimulen l'absorció i metabòlits que inhibeixen el creixement de fitopatògens (sideròfors, antibiòtics i enzims lítics de la paret cel·lular, entre d'altres). Alguns exemples d'aquests bacteris són: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azobacter*, *Enterobacter*, *Xanthomonas*, *Klebsiella* i *Serratia*.
- Trichoderma sp. És un agent de biocontrol que també pot actuar com a biofertilitzant i fitoestimulants quan s'associa a les arrels de les plantes i a la rizosfera, ja que és capaç de colonitzar les arrels de forma similar a les micorrizes, estimular el creixement de les plantes i activar-ne els mecanismes de defenses.

Tal i com exposen Benítez *et al.* (2004) i Howell (2003), els mecanismes d'acció del gènere *Trichoderma* com a agent de biocontrol es poden dividir entre mecanismes directes i indirectes. El principal mecanisme directe és el micoparasitisme, que és l'atac directe de *Trichoderma* a altres fongs fitopatògens mitjançant l'alliberació de diferents enzims. El micoparasitisme comprèn un seguit de canvis morfològics en l'estructura de *Trichoderma* que permeten penetrar l'hoste i, posteriorment, la segregació d'enzims que degraden conjuntament la paret cel·lular del fong fitopatogen (quitinases, glucanases i proteases). Pel que fa als mecanismes indirectes, són:

- Competència.
 - o Fungostasi. Les soques de *Trichoderma* poden resistir i multiplicar-se ràpidament en condicions que mantenen inactiu el fong fitopatogen, com per exemple davant la presència de metabòlits de determinades plantes o de productes químics (fungicides, herbicides, etc.).
 - o Nutrients. La falta de nutrients és una de les principals causes de mort dels microorganismes, especialment quan es tracta d'un nutrient o mineral essencial com el ferro. *Trichoderma* té una capacitat superior a la d'altres microorganismes per mobilitzar i agafar nutrients del sòl, ja que pot obtenir ATP a partir del metabolisme de diferents tipus de sucres. A més de l'eficàcia en la competència de nutrients, algunes soques de *Trichoderma* poden produir sideròfors altament eficients que actuen com a quelants de ferro i impedeixen que aquest estigui disponible per altres fongs, mentre que d'altres poden competir alhora pels nutrients i per la colonització de la rizosfera.
- Biofertilització i estimulació dels mecanismes de defensa de la planta.
 - o Colonització de l'arrel de la planta. La colonització de l'arrel és el pas previ perquè *Trichoderma* pugui produir la resta d'efectes de biofertilització i estimulació de la planta. Aquesta colonització provoca canvis morfològics importants a la planta degut a la segregació de flavonoides i auxines. A més, algunes soques de *Trichoderma* que penetren l'epidermis indueixen la síntesi i acumulació

de fitoalexines, flavonoides, terpens, derivats fenòlics, aglicones i altres compostos antimicrobians de la planta als que *Trichoderma* és més resistent que els fongs fitopatògens.

- Biofertilització. La colonització, com s'explicava a l'apartat anterior, indueix la producció de fitohormones que augmenten el creixement i desenvolupament de l'arrel, la capacitat de captació de nutrients, la capacitat de resistència a l'estrès, la germinació de les llavors i la productivitat en general. A més, es produeix una acidificació de l'ambient que permet la solubilització de fosfats, micronutrients i cations minerals (ferro, manganès i magnesi) que podran ser captats per la planta.
- Estimulació de la resistència de la planta i de l'activació dels seus mecanismes de defensa. S'activen els mecanismes de defensa de la planta davant els microorganismes patògens, tant de l'arrel com de les parts aèries, per mecanismes similars a les respostes d'hipersensibilitat (HR), resistència sistèmica adquirida (SAR) i resistència sistèmica induïda (ISR).
- Modificació de la rizosfera. Les modificacions de la rizosfera són degudes a l'alliberació d'antibiòtics i metabòlits tòxics i a la disminució del pH. El control del pH permet establir els metabòlits propis de *Trichoderma* i inactivar les substàncies tòxiques d'altres microorganismes (que requereixen un rang de pH diferent), així com induir la transcripció de proteases, glucanases i proteïnes de la paret cel·lular.
- Antibiosi. *Trichoderma* és capaç d'alliberar antibiòtics i components de baix pes molecular que difonen en la rizosfera i inhibeixen el creixement d'altres microorganismes i n'impedeixen la colonització de l'ambient. Aquestes molècules poden interactuar entre elles per produir efectes sinèrgics, com és el cas d'alguns antibiòtics amb els enzims hidrolítics o de peptabiols amb enzims que degraden la paret cel·lular.

desplaçament de la microbiota autòctona que també s'ha de controlar mitjançant analítiques microbiològiques periòdiques.

Verticillium dahliae

El gènere *Verticillium* pertany a la subdivisió *Deuteromycota* i a la Classe *Hyphomycet*. Morfològicament es caracteritza per tenir a les hifes uns nòduls equidistants on es situen els conidiòfors amb fiàlids que formen una estructura verticil·lada (Figura 9). Les espècies d'aquest gènere, unes 50, són un grup molt heterogeni i moltes són importants en agricultura per ser sapròfites o patògens de plantes, nematodes o d'altres fongs. La seva elevada diversitat es deu, possiblement, a que presenten fenòmens de parasexualitat (Pegg i Brady, 2002). *Verticillium dahliae* és l'agent causal de la verticilosi de l'olivera. Morfològicament presenta conidiòfors hialins abundants, erectes, que acaben en el patró verticil·lat característic del gènere (Figura 10).

El cicle de vida de *V. dahliae* consta de 4 fases (Hiemstra, 1998) (Figura 11):

- Fase de supervivència. Els responsables de la supervivència i dispersió del patògen són els microesclerocis (MC) que es troben a les primeres capes del sòl, on poden sobreviure fins a 13 anys en absència d'hostes.
- Fase d'infecció. Els MC són estimulats per germinar en resposta a exsudats radicals de diferents plantes i per l'addició de nutrients al sòl. Durant la germinació, els MC produeixen petites hifes infectives que penetren la soca de les arrels joves de la planta i, al cap de 7-15 dies, arriben al sistema vascular i es perpetua la infecció.
- Fase de colonització. Quan *Verticillium dahliae* arriba al xilema, s'estén per creixement miceliar i colonitza la planta mitjançant la formació de conidis que seran transportats a zones superiors de la planta seguint el flux de la sàvia. La

colonització del sistema vascular provoca una oclusió dels vasos i els símptomes típics de la malaltia.

- Fase de desenvolupament de símptomes. Els metabòlits tòxics del fong, juntament amb l'oclusió dels teixits vasculars provoquen la defoliació i el marciment característics de la malaltia. Altres canvis patològics es poden produir com a resposta de la planta a la infecció, que intentarà reduir l'aportació hídrica a les zones infectades, reforçar les parets cel·lulars dels vasos del xilema i dipositar substàncies protectores com fitoalexines i fenols.

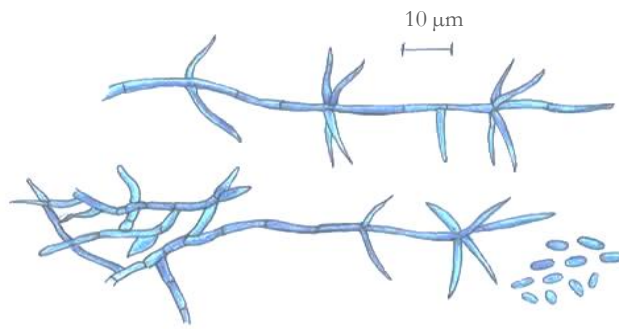


Figura 9. Representació esquemàtica de l'estructura típica del gènere *Verticillium*.

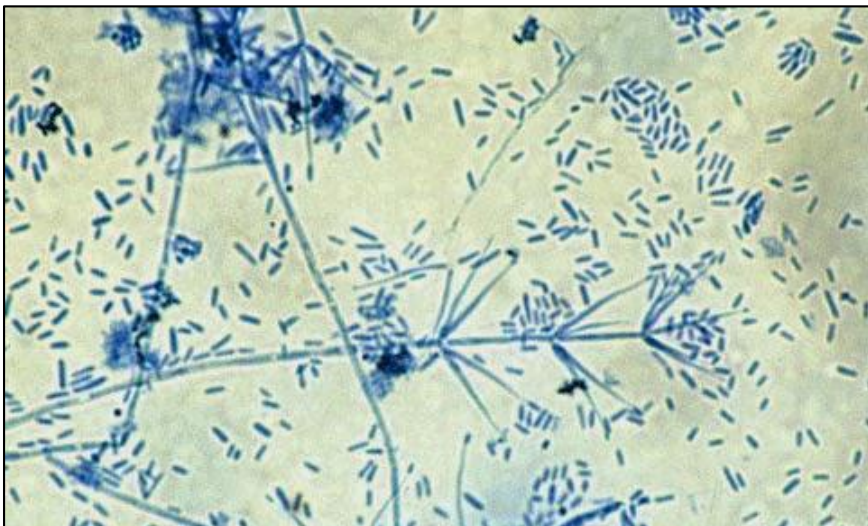


Figura 10. Aspecte al microscopi òptic d'una soca de *Verticillium dahliae* (x1000).

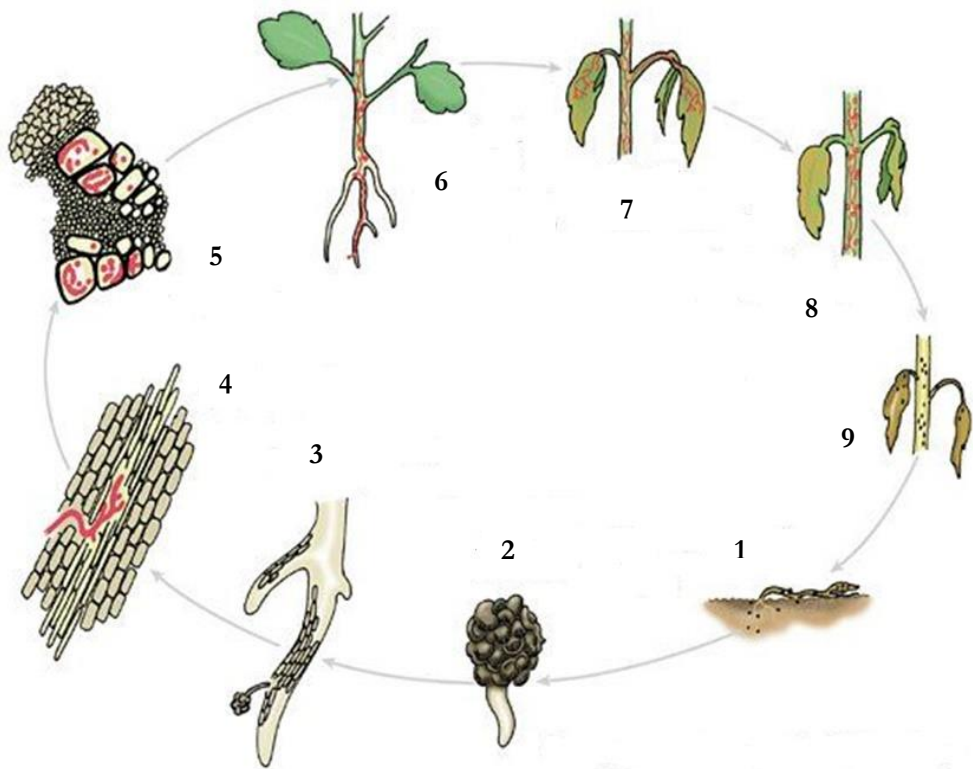


Figura 11. Representació del cicle de vida de *Verticillium dahliae* a l'olivera. Presència de microesclerocis lliures al sol (1) que germinen per la presència d'exsudats radiculars (2). El fong penetra l'arrel de la planta (3) fins a arribar al còrtex de l'arrel (4) i al xilema dels vasos (5), multiplicant-se i colonitzant el sistema vascular (6), causant clorosi, necrosi i defoliació (7). Finalment, el fong colonitza les fulles senescentes que acabaran caient al sòl (8), on desenvolupa nous microesclerocis (9). (Adaptat de Vickie Brewster i Jesse Ewing).

Verticillium dahliae com a agent fitopatogen de l'olivera en pre-collita

Antecedents

La verticilosi de l'olivera es va diagnosticar per primer cop a Itàlia l'any 1946 (Ruggieri, 1946), i no va ser fins l'any 1980 que va ser descrita a Espanya (Caballero *et*

al., 1980). Actualment la seva distribució és al llarg de tota la conca Mediterrània i la costa oest d'Estats Units.

Quan a la patologia, estudis de Síria posen de manifest que en aquest país la malaltia afecta entre el 0.9 i el 4.5% d'un total de 6.5 milions d'oliveres, el que suposa una pèrdua total estimada d'entre un 1 i un 2.3% de la producció anual d'olives (Al-Ahmed i Mosli, 1993). D'altra banda, una prospecció realitzada a Grècia (Thanassouloupoulos *et al.*, 1979) estima que afecta un 2-3% de 14 milions d'arbres i que les pèrdues en la collita d'olives són d'un 1% de la producció total del país. A Marroc, estudis publicats per Serrhini i Zeroulen l'any 1995 descriuen una incidència del 10% fins al 30% en 128 parcel·les mostrejades, mentre que a Algèria la mitjana d'oliveres afectades és del 12%, detectant focus de la malaltia en la majoria de regions oliveres del país (Bellahcene *et al.*, 2000). Aquestes dades reflecteixen l'àmplia distribució de la verticilosi a la conca del Mediterrani i a la majoria de països productors, el que fa que sigui considerada pels especialistes com una de les malalties més greus de les que afecten les oliveres.

A Espanya, la verticilosi és identificada per primer cop el 1975 en camps experimentals de Córdoba (Caballero *et al.*, 1980) i la primera prospecció determina que un grau d'incidència mitjana del 10%, dada que es manté en inspeccions realitzades posteriorment a camps d'Andalusia (Sánchez Hernández *et al.*, 1998). En els últims anys la malaltia s'ha estès a noves províncies on els brots són cada cop més freqüents, com Córdoba, Jaén, Sevilla, Castilla-la-Mancha i València (Jiménez Díaz, 2003).

La morbiditat i la mortalitat de la verticilosi depenen de la densitat del patogen en el sòl (UFC/cm²) i de la taxa d'infecció, que determina la velocitat de propagació de la malaltia. La taxa d'infecció depèn de: (1) la susceptibilitat de la planta (edat i qualitat de nutrició), (2) el patotip de *Verticillium dahliae*, essent el patotip defoliant el més agressiu i (3) les característiques ambientals (temperatura, humitat, tipus i maneig del sòl). Actualment, es considera que la morbiditat mitjana és del 12% de la població i que la mortalitat mitjana és del 2% dels infectats (Ruiz Baena *et al.*, 2008).

Solucions actuals

La verticilosi és una malaltia difícil de controlar degut a la presència del fong al sòl i a l'arbre, el que afavoreix les infeccions recidivants, i a altres factors com la perllongada supervivència de *V. dahliae* al terra, la possibilitat d'infestar altres varietats de plantes, la dificultat de ser eliminat mitjançant fungicides tòpics un cop s'ha produït la malaltia i a la gran variabilitat de patotips presents al sòl.

Les mesures de lluita integrada adoptades actualment contra la verticilosi poden ser prèvies o posteriors a la plantació (Bejarano, 2003; Blanco i Jiménez, 1995). Les mesures de control prèvies són: (1) elecció de terres no infectats (quan es busca un nou emplaçament per un cultiu d'oliveres, no es recomana establir-lo en un terra on, durant anys, s'hagin plantat cultius susceptibles a la malaltia) i (2) ús de material vegetal lliure del patogen.

Les mesures de control un cop el patogen s'ha establert al sòl són:

- Control químic. Els tractaments químics efectius són les barreges de bromur de metil i cloropicrina, ja que ambdós tenen un efecte sinèrgic sobre un ampli espectre de patògens del terra. També es poden fer servir el metham-sodi o el metham-potassi i altres químics d'acció semblant. Normalment, l'ús de productes químics està limitat degut al seu cost, dificultat d'aplicació, toxicitat i perjudicis a nivell mediambiental. A més, existeixen moltes restriccions quan a l'ús de fungicides al sòl degut a l'impacte que provoquen a nivell mediambiental i sobre la salut humana, com és el cas del bromur de metil (Subbarao, 2002). En l'olivera, el principi actiu autoritzat per la lluita integrada autoritzada és el metham-sodi combinat amb la solarització, i està especialment indicat en casos de substitució d'arbres infectats per arbres sans. Dins el control químic també s'inclou l'ús de vacunes i la injecció de diversos principis actius al tronc de l'olivera (Navarro *et al*, 1992), el que permet una reducció dels símptomes però no elimina el fong. En aquests casos, un dels productes més utilitzats és el benomil (Mule *et al*, 2000).

- Solarització. És un procés hidrotèrmic que provoca un efecte hivernacle sobre un terra humit quan es cobreix amb una capa de plàstic transparent. Aquesta mesura ha resultat efectiva per la reducció de patògens del terra en general, i s'ha demostrat la seva efectivitat per la verticilosi de l'olivera (Bejarano i Ibrahen, 2004). En general, la solarització permet reduir la concentració de *Verticillium dahliae* en els primers 20 cm del terra i aplicacions successives de la tècnica no permeten augmentar-ne l'efectivitat.

OLFACTE CANÍ

Anatomia i Fisiologia

L'olfacte és la percepció d'olors que resulta de la detecció de partícules odorants disperses al medi ambient. Per a molts mamífers l'olfacte és el mitjà principal per percebre la informació rellevant de l'ambient que els envolta. Els animals macro-somàtics, com el gos, tenen molt desenvolupat el sistema olfatori i aquest té un paper important quan a seguretat, nutrició i qualitat de vida.

El sentit de l'olfacte del gos es caracteritza per la seva elevada sensibilitat i per la seva capacitat de discriminació. Per una gran varietat de compostos, la concentració mínima a l'aire que pot ser captada per l'olfacte del gos és entre 10^3 i 10^8 cops inferior a la detectable pels humans (Taula 1).

Referent a la capacitat de discriminació, el gos és capaç de discriminar entre diferents estímuls olfactors presumiblement molt semblants. Per exemple, gossos correctament ensinistrats poden arribar a distingir entre parelles de bessons univitel·lins mitjançant la seva olor (que d'altra banda, en termes genètics és teòricament idèntica) (Manteca, 1996).

Taula 1. Concentracions mínimes de varies substàncies (expressades en molècules/cm³ d'aire) que poden ser detectades per l'olfacte del gos i dels humans. Per algunes substàncies, l'olfacte del gos és fins a 100 milions de cops més sensible que el dels humans (Manteca, 1996).

Substància	Gos	Humà
Àcid acètic	5.0×10^5	5.0×10^{13}
Àcid propiònic	2.5×10^5	4.2×10^{11}
Àcid butíric	9.0×10^3	7.0×10^9
Àcid valèric	3.5×10^4	6.0×10^{10}
Àcid caproic	4.0×10^4	2.0×10^{11}
Àcid caprílic	4.5×10^4	2.0×10^{11}

Els receptors responsables de la transducció de les molècules oloroses es troben a la mucosa olfactiva que, en el gos, té una superfície de 18 a 150 cm² (1 a 2 cm² en l'ésser humà) i es localitza a la part superior de la cavitat nasal, superfície inferior de la làmina cribiforme, porció superior del *septum* nasal i paret medial dels cornets superiors (Correa, 2011) (Figura 12).

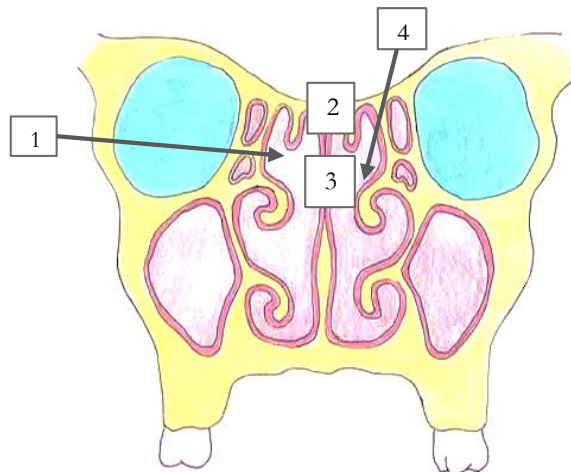


Figura 12. Representació d'un tall del meatus nasal. La mucosa nasal es localitza a la part superior de la cavitat nasal (1), superfície inferior de la làmina cribiforme (2), porció superior del *septum* nasal (3) i paret medial dels cornets superiors (4).

La mucosa olfàctòria està recoberta per una capa de moc que cobreix l'epiteli olfatori i que facilita capturar i dissoldre les molècules volàtils de l'aire. L'epiteli olfatori conté tres tipus de cèl·lules i un tipus especialitzat de glàndula (Figura 13):

- Neurons receptors. Els cossos de les neurones receptors es localitzen a la porció basal de l'epiteli olfatori. Cada neurona posseeix una prolongació dendrítica apical i un axó no mielinitzat. La dendrítica apical s'estén cap a la superfície de l'epiteli i forma una vesícula olfàctòria amb cilis no mòbils que contenen els receptors. Els axons no mielinitzats travessen la làmina cribosa de l'etmoide i s'agrupen formant fascicles que, en conjunt, constitueixen el nervi olfatori (primer parell cranial).
- Cèl·lules de suport. Són cèl·lules columnars que presenten microvellositats secretores de moc, alhora que actuen com a mecanisme de suport mecànic.
- Cèl·lules basals. Són cèl·lules no diferenciades, primitives, que permeten el recanvi de les neurones receptors.
- Glàndules de Bowman. Són estructures que només es troben a la mucosa olfàctòria i que produeixen secreció serosa que, juntament amb les cèl·lules de suport, formen la capa de moc que recobreix la mucosa.

Quan les partícules oloroses volàtils són inhalades entren en contacte amb la capa de moc que recobreix la mucosa i interactuen amb proteïnes transportadores que activen el sistema de transducció basat en l'activació de proteïnes G olfàctòria-específiques i cAMP. El gos posseeix uns 220 milions de receptors olfàctius diferents, mentre que l'ésser humà només en disposa de 5 milions. El nombre de receptors olfàctius pot variar substancialment entre les diferents races de gos (Taula 2).

Aquesta activació genera un impuls nerviós que es transmet pel nervi olfatori cap al bulb olfatori del cervell, on es reconeix l'olor i s'inicia una resposta. En el cas dels gossos entrenats per buscar una olor específica, aquesta resposta serà una conducta prèviament apresada com, per exemple en el cas dels gossos entrenats per detectar explosius, asseure's i mirar fixament el punt de màxima emanació d'olor.

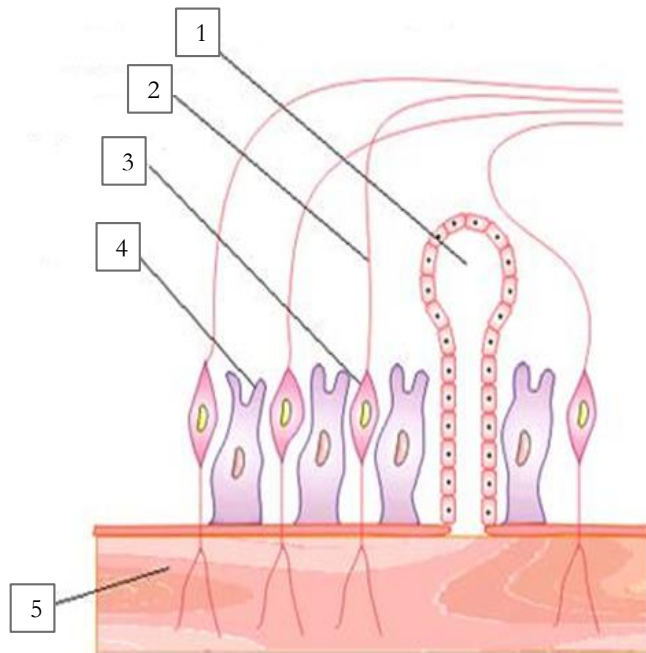


Figura 13. Origen de les fibres nervioses i tipus cel·lulars que acabaran formant el Nervi Olfactori o Primer Parell Cranial. 1: Glàndules mucoses de Bowman, 2: Fibra nerviosa, 3: Cèl·lules olfactivores, 4: Cèl·lules de suport; 5: Cavitat nasal (Adaptat d'Osuna i Rubiano).

Taula 2. Comparació del nombre de receptors a la mucosa olfactivora de l'espècie humana i diferents races de gos (Adaptat de Tacher *et al.*, 2005).

Espècie o raça	Nombre de receptors olfactivos
Humà	5 milions
Teckel	125 milions
Fox Terrier	147 milions
Beagle	225 milions
Pastor Alemany	225 milions
Bloodhound	300 milions

El bulb olfatori, que correspon al còrtex cerebral, està localitzat a la cara inferior del lòbul frontal i està connectat recíprocament amb altres regions del còrtex olfatori o paleocòrtex, com el còrtex orbitofrontal, l'ínsula, l'hipotàlem, l'amígdala i l'hipocamp. Quan rep un estímul olfatori, el bulb olfatori envia projeccions nervioses a l'amígdala, concretament a l'amígdala olfactiva, que inclou els nuclis corticals anterior i postero-lateral (Figura 14).

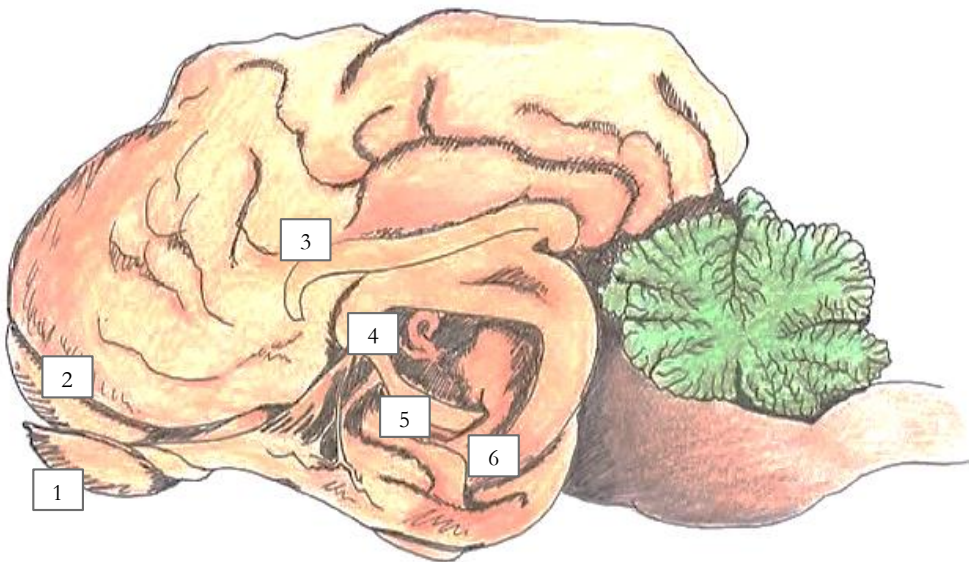


Figura 14. Representació de les parts de l'encèfal relacionades amb l'olfacció. 1: bulb olfatori, 2: còrtex orbito-frontal, 3: ínsula, 4: hipotàlem, 5: amígdala, 6: hipocamp.

Algunes d'aquestes estructures, com per exemple l'amígdala, són responsables de les conductes i reaccions emocionals i s'aprofita la seva activació durant la instrucció del gos per a reforçar conductes desitjables. La relació entre la conducta, l'aprenentatge i l'olfacció serà tractada més endavant a l'apartat "Neuropsicologia: Control de la conducta".

Finalment, els gossos posseeixen una càmera olfactiva addicional anomenada òrgan vomeronasal o de Jacobson (situada a l'os vòmer, entre la cavitat nasal i bucal, Figura 15), amb receptors específics per feromones i altres elements volàtils d'elevat

pes molecular. Les neurones que formen part de l'epiteli olfatori de l'òrgan vomeronasal són diferents de la cavitat nasal i, a més d'enviar informació al bulb olfatori, envien impulsos a la regió hipotalàmica associada a les conductes sexuals.

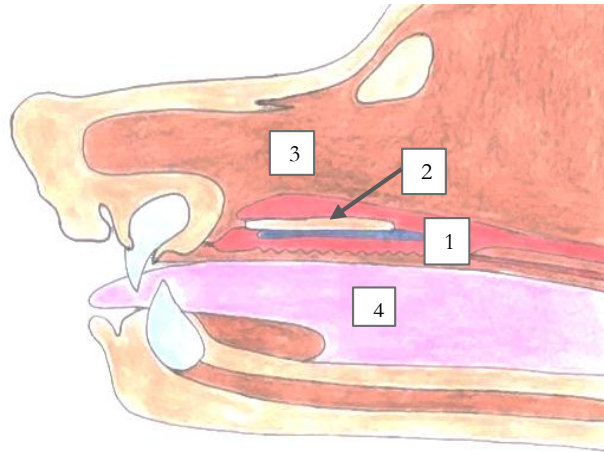


Figura 15. Representació de la situació anatómica de l'Òrgan Vomeronasal o de Jacobson (1).
L'Òrgan vomeronasal està situat a l'os vòmer (2), entre la cavitat nasal (3) i bucal (4).

Òrgan Vomeronasal i Feromones

Tal i com explica Manteca, X. al seu llibre *Etología Clínica Veterinaria del Perro y del Gato* (1996), les feromones es defineixen com a substàncies químiques o mescles de substàncies químiques que, emeses a l'exterior per un animal, produeixen determinats efectes en els receptors d'un individu de la mateixa espècie. D'acord amb els efectes que produeixen, es diferencien dos tipus de feromones:

- Feromones encebadores. Són les que produeixen canvis fisiològics en l'individu receptor, especialment canvis neuro-endocrins relacionats amb la fisiologia reproductora. Aquests canvis es manifesten de forma immediata i, un cop produïts, influeixen en la conducta del receptor durant un cert temps.

- Feromones desencadenants. Són les que produeixen canvis immediats i de curta duració en la conducta del receptor.

La composició química de la majoria de feromones dels animals vertebrats és desconeguda. Així i tot, és útil classificar-les també com a feromones volàtils i no volàtils. En general, les feromones volàtils són captades per la mucosa olfactiva i són desencadenants; per altra banda, les feromones no volàtils solen ser encebadores i són captades per l'òrgan vomeronasal.

En els carnívors domèstics, l'òrgan vomeronasal es comunica amb la cavitat bucal a través del conducte nasopalatí. Els axons de les neurones receptores de l'òrgan vomeronasal acaben en una estructura del sistema nerviós central denominada bulb vomeronasal o bulb olfactivi accessori. A partir del bulb olfactivi accessori, la via nerviosa vomeronasal continua pels nuclis medials i posteromedials de l'amígdala vomeronasal i, a partir d'aquesta, es projecta fins les àrees preòptica i medial de l'hipotàlem. Així, tot i que la mucosa olfactiva i l'òrgan vomeronasal envien les seves projeccions nervioses cap a l'amígdala, ho fan a nuclis diferents i poden considerar-se dos sistemes olfactivs separats i que tenen funcions diferents.

L'efecte que pot desencadenar una feromona sobre la conducta és important i molt ràpid, pel que les feromones poden influir notablement en les pautes d'ensinistrament i de treball que es pretenen establir en aquesta tesi.

NEUROPSICOLOGIA: CONTROL DE LA CONDUCTA

El sistema nerviós és el responsable de la conducta. Es divideix en dos elements bàsics: el sistema nerviós central (SNC) i el sistema nerviós perifèric (SNP). El SNC està constituït per l'encèfal (cervell, cerebel i medul·la oblonga) i la medul·la

espinal. El SNP està format pels nervis cranials i els nervis espinals i, en general, les neurones del SNP connecten els teixits amb el SNC.

Sistema nerviós perifèric: efectes destacats sobre la conducta

En el SNP es distingeixen una divisió aferent, que transmet informació sensorial, i una divisió eferent, que porta senyals des del SNC als músculs i glàndules. Dins la divisió eferent es poden diferenciar vies del sistema nerviós somàtic (SNS), format per fibres nervioses que van del SNC a les cèl·lules dels músculs esquelètics, i del sistema nerviós autònom (SNA), que regula els processos automàtics.

El SNA es compon del sistema nerviós autònom simpàtic (SNAS) i el sistema nerviós autònom parasimpàtic (SNAP). El SNAS regula l'energia i les funcions corporals que ajuden en les situacions d'emergència. Afecta la freqüència cardíaca i la pressió arterial, inhibeix el tracte digestiu, accelera el ritme respiratori i prepara el cos per l'acció mitjançant l'activació de la secreció d'adrenalina i l'augment del nivell de glucosa a la sang. El SNAS s'associa al mecanisme de fugida o de lluita. D'altra banda, el SNAP contraresta el sistema simpàtic i retorna l'equilibri al cos.

Lindsay (2000) descriu la forma en que els gossos poden tenir una predisposició genètica cap a una reactivitat emocional o bé a una tendència cognitiva i calmada. Explica que alguns gossos poden tenir un sistema simpàtic dominant (són propensos a la reactivitat emocional o a l'estrès biològic) i altres un sistema parasimpàtic dominant (més calmats i adaptables). Lindsay conclou que els gossos de temperament en el que predomina el sistema simpàtic són més propensos als problemes de conducta.

Aquest fet és d'especial importància quan s'ha de realitzar una selecció d'un gos de treball, ja que depenent de l'especialitat es buscarà la predominança d'un

temperament o altre. En el cas de les UC de biodetecció, és preferible un sistema parasimpàtic dominant.

Sistema nerviós central: efectes destacats sobre la conducta

De les tres estructures que formen el SNC (cervell, cerebel i medulla oblonga), el cervell és el que té un efecte més rellevant sobre la conducta. El cervell està format pel cervell anterior, mig i posterior. El cervell mig i posterior formen el tall cerebral i controlen funcions vitals bàsiques com l'activitat cardiovascular i respiratòria. El cervell anterior es compon del sistema límbic i el còrtex cerebral, entre d'altres estructures. El sistema límbic està format per una sèrie d'estructures que envolten l'hipotàlem, i el còrtex cerebral és la part més externa del cervell anterior.

Sistema límbic

El sistema límbic inclou les següents estructures del cervell: el bulb olfactori, el tàlem, l'hipotàlem, l'hipocamp, l'amígdala i la circumval·lació del cos callós del còrtex cerebral, a més d'altres estructures més petites anomenades nuclis. El sistema límbic està implicat sobretot en l'expressió i el processament de les emocions, la memòria i l'agressivitat, alhora que també coordina alguns tipus d'aprenentatge.

El tàlem rep senyals sensorials i les respostes emocionals per, posteriorment, processar-les i comunicar-les al sistema límbic (centre emocional) i el còrtex cerebral (centre cognitiu). El tàlem permet al gos centrar-se o concentrar-se de forma selectiva en una sola cosa, actuant com a intermediari o com una estació de recepció i distribució d'informació.

L'hipotàlem generalment desenvolupa funcions reguladores de les activitats biològiques bàsiques com el control de la gana i la sacietat, la set i funcions homeostàtiques com la regulació de la pressió sanguínia, la temperatura i la glucèmia. Controla gran part del sistema endocrí i, en part, regula el cicle de son i vigília. L'hipotàlem regula l'activitat simpàtica i parasimpàtica, alhora que forma part del sistema hipotalàmic-hipofisiari-adrenal (eix HHA) que s'encarrega del control homeostàtic de les respostes del cos a l'estrès i a l'amenaça.

L'amígdala controla l'afectivitat de l'individu, així com l'expressió de la por i de l'agressivitat. S'associa a la conducta depredadora i a la inhibició o excitació de la conducta social. També juga un paper important en l'aprenentatge emocional i és la part del sistema límbic que intervé en el reconeixement d'altres individus, la conducta sexual i maternal, la conducta agressiva i la selecció de l'aliment. El sentit de l'olfacte també està altament implicat en el control d'aquestes conductes en la majoria de mamífers, entre ells el gos.

La circumval·lació del cos callós coordina la informació sensorial rebuda amb les emocions i les respostes emocionals del dolor, i és un dels principals centres de control de la conducta de motivació.

L'hipocamp té com a funció la consolidació de nous records i emocions, així com la navegació i orientació espacial. En els gossos, l'hipocamp sembla ser important per rectificar líndars de por baixos i estats perllongats d'excitació ansiosa generalitzada, típics de gossos de treball als que de forma errònia se'ls condiona de forma molt intensa abans de treballar.

Còrtex cerebral

El còrtex cerebral és la part externa del cervell i l'última en desenvolupar-se. És l'àrea essencial de la consciència i la intel·ligència i porta a terme les funcions associatives més complexes. Està íntimament involucrat amb les funcions cognitives

més complexes com l'aprenentatge, la resolució de conflictes i la planificació i execució de conductes. Les connexions nervioses que van de l'amígdala (control dels impulsos emocionals) al còrtex són més rellevants i nombroses que les que van del còrtex a l'amígdala, això explicaria perquè alguns gossos semblen no controlar completament alguns impulsos altament emocionals (per exemple la por, l'agressivitat o la presència d'un estímul que els exciti).

Sistema límbic *vs* còrtex cerebral (emoció *vs* cognició)

Tant la informació percebuda pels sentits com la informació emocional passen del sistema nerviós perifèric al tàlem. Des del tàlem la informació va als lòbuls posteriors del cervell per ser descodificada en funció de l'experiència i els processos d'aprenentatge previs. Posteriorment, aquesta informació s'envia al lòbul frontal, on s'avalua i es formula un pla d'acció.

El sistema límbic i el còrtex cerebral treballen conjuntament per produir un efecte final d'una amalgama de contingut emocional i major contingut cognitiu. Existeix una relació inversa entre l'activitat del còrtex cerebral i la del sistema límbic: quan un s'activa, l'altre s'inhibeix.

Si un individu experimenta una resposta emocional intensa (activació del sistema límbic), probablement serà menys capaç d'actuar de forma clara i efectiva (inhibició del còrtex cerebral). De la mateixa manera, si un gos està fent servir el còrtex cerebral i roman en un estat *analític* (còrtex activat), és menys probable que es mostri excessivament emocional (sistema límbic inhibit).

Aquesta dada és extremadament important perquè comporta implicacions immediates en la forma en que un gos ensinistrat pot reaccionar o no durant el treball, així com en la modificació de conductes no desitjades. Si es permet que un gos estigui

contínuament immers en respostes emocionals intenses, és probable que no pugui aprendre de forma efectiva o eficient, el que indica que s'han d'evitar les respostes sensibilitzadores durant l'ensinistrament i l'excitació intensa durant el treball. Alhora, també s'extreu que concentrar-se en una tasca cognitiva pot ser essencial per inhibir respostes d'estrès, el que és bàsic per demostrar que el treball que realitzen els gossos contribueix a complir amb la normativa de benestar animal.

Neurotransmissors i conducta

Els neurotransmissors (NT) són secrecions de naturalesa química que generen respostes elèctriques quan són alliberats a les sinapsis nervioses transmetent, d'aquesta forma, informació. Exciten, inhibeixen i regulen l'activitat neuronal i hormonal. Els NT es sintetitzen a partir de substàncies precursors, algunes produïdes pel propi organisme i d'altres obtingudes a través de la dieta. Un cop que un NT completa la seva funció, pot ser reabsorbit per la neurona pre-sinàptica o destruït a l'espai sinàptic. Alguns dels NT més importants en el control de la conducta són la dopamina, la serotonina, el glutamat i l'àcid gamma-amino-butíric (GABA).

La dopamina està relacionada en la coordinació motora i el temps de reacció (sistema nigro-estriat) i l'atenció (sistema meso-hipocampal). Una deficiència de dopamina pot provocar alteracions de l'aprenentatge i de la capacitat d'atenció, així com de l'afectivitat, l'estat d'ànim (irritabilitat, ansietat) i una disminució d'endorfines. D'altra banda, un excés de dopamina porta a l'agitació, la conducta impulsiva i la hiperreactivitat

La serotonina regula el dolor i els cicles de son i vigília. Tot i que una activitat baixa de serotonina produeix ansietat, dificultats d'aprenentatge i agressivitat, el seu efecte més directe és la reducció del control dels impulsos. Un gos amb poca serotonina serà un gos amb tendència a la impulsivitat, el que és especialment important en gossos amb un component agressiu.

El glutamat transmet missatges excitadors, mentre que l'àcid gamma-amino-butíric o GABA és el principal NT inhibitori que impedeix que les neurones reaccionin de forma descontrolada. Aquests dos NT controlen l'homeòstasi de l'activitat nerviosa i, si un dels dos es descompensa, el sistema nerviós es dispararà o inhibirà de forma efectiva. El glutamat i el GABA suposen entre el 75-80% de l'activitat neurotransmissora del cervell, actuant la resta de NT com a moduladors d'aquesta activitat.

Hormones i conducta

El sistema nerviós està íntimament lligat al sistema endocrí, que és el responsable de la regulació fisiològica de l'organisme. El sistema endocrí està format per diverses glàndules que secreten hormones sota el control, sobretot, de l'hipotàlem. Les glàndules del sistema endocrí són, per definició, de secreció interna; així, les hormones són transportades pel torrent sanguini i cada una té el seu teixit diana. Les hormones que més es relacionen amb la conducta són la testosterona, el cortisol i la tiroxina (T4).

La testosterona, sintetitzada als testicles i en menor mesura al còrtex adrenal, ovaris i placenta, actua per originar les conductes sexualment dimòrfiques típicament masculines i per regular determinades conductes. Així, la testosterona permet que els animals estiguin atents durant més temps i que responguin de forma més vigorosa als estímuls. D'altra banda, també és la responsable de conductes habitualment no desitjables com el vagabundeig, el marcatge amb orina i l'agressivitat ofensiva.

El cortisol, també conegut com l'hormona de l'estrès, és sintetitzat al còrtex adrenal i alliberat en petites quantitats al llarg de cicles diaris, actua incrementant la pressió arterial, la glucèmia, la producció de glicogen al fetge i en tots els processos relacionats amb incrementar l'esforç físic. L'exposició al cortisol per un període curt de temps, relacionat amb moments d'estrès intens, promou l'emmagatzematge de

records per ajudar a recordar les circumstàncies que envolten una situació d'intensitat important. Així, el cortisol és el responsable dels fenòmens de sensibilització i pot ser especialment problemàtic en el desenvolupament de fòbies i comportaments agressius. L'exposició al cortisol per un període llarg tendeix a danyar les cèl·lules de l'hipocamp i, en conseqüència, a perjudicar el procés d'aprenentatge. Un animal amb estrès crònic no serà capaç d'aprendre bé, el que té implicacions òbvies a l'hora de tractar problemes relacionats amb l'estrès i de realitzar modificacions de conducta.

La tiroxina (T4) és sintetitzada a la glàndula tiroides i una de les seves funcions és regular, indirectament, la producció de serotonina. Si existeix una deficiència en la producció de tiroxina (hipotiroïdisme, que pot ser primari o secundari) apareixeran canvis conductuals com una disminució de l'activitat física general juntament amb impulsos agressius. L'hipertiroïdisme, que també pot manifestar-se amb problemes de conducta, no és una patologia freqüent en el gos.

REVISIÓ BIBLIOGRÀFICA REFERENT A L'ÚS DE L'OLFACTE CANÍ COM A MÈTODE DE DETECCIÓ

El gos domèstic (*Canis familiaris*) és capaç de detectar substàncies a una concentració molt menor de la que som capaços de detectar els éssers humans gràcies a disposar d'una major àrea d'epiteli olfactiu i d'un major nombre de receptors. Aquesta gran capacitat olfactiva ha propiciat que l'home faci servir els gossos per buscar i localitzar un elevat nombre de substàncies tant d'origen biològic com no biològic (Browne *et al.*, 2006).

Dins el grup de substàncies d'origen no biològic hi destaquen especialitats com la recerca, detecció i localització d'explosius (Furton *et al.*, 2001), accelerants de

foc (Kurz *et al.*, 1994), drogues i estupefaents (Lorenzo *et al.*, 2003) i contaminants ambientals d'origen químic (Crook, 2000).

Pel que fa a la detecció de substàncies d'origen biològic, existeix un gran ventall de subespecialitats que es poden dividir en:

- Detecció de mamífers. Els gossos s'entrenen per buscar descamacions epitelials de diferents tipus de mamífers, habitualment amb l'objectiu de promoure i contribuir a la conservació mediambiental i a mantenir la biodiversitat (Smith i Ralls, 2001). Algunes espècies de mamífers amb les que es treballa actualment són les guineus de Sant Joaquim (Smith *et al.*, 2003), els ossos negres i bruns (Wasser *et al.*, 2004; Akenson *et al.*, 2001) i les fures de potes negres (Reindl *et al.*, 2004). Una altra especialitat que s'inclou dins la detecció de mamífers és la detecció d'olors pròpies de l'estre en les vaques lleteres (Kiddy *et al.*, 1978; Kiddy *et al.*, 1984; Hawk *et al.*, 1984) en fluids corporals i llet amb la finalitat de millorar la detecció de l'estre i optimitzar les inseminacions artificials.
- Detecció de rèptils. Actualment el principal ús de la detecció de rèptils amb unitats canines és el control d'espècies al·lòctones invasores (Browne, 2005), i en aquest àmbit destaca el control de l'espècie *Boiga irregularis* que es porta a terme a Guam, Àfrica (Engeman *et al.*, 1998; Engeman *et al.*, 2002).
- Detecció d'insectes. La principal aplicació de la detecció d'insectes és la bioseguretat i el control de plagues (Nakash *et al.*, 2000), i es pot treballar en la detecció de feromones, ous (Wallner i Ellis, 1976), larves i formes adultes (Welch, 1990). Una de les aplicacions actuals més importants és la detecció de tèrmits (Lewis *et al.*, 1997; Culliney i Gracie, 2000; Brooks *et al.*, 2003).
- Detecció d'efluvis humans. Dins aquest apartat s'hi inclouen especialitats tant diverses com el rescat i salvament de persones (Hebart, 1993), cadàvers, secrecions i restes humanes (Schoon, 1996) i tombes humanes clandestines (Lasseter *et al.*, 2003). Una especialitat que ha sorgit recentment i que també es pot incloure en aquest grup és la detecció de cèl·lules canceroses, en les que

destaquen la detecció de neoplàsies de cèl·lules basals de la bufeta urinària (Willis *et al.*, 2004) i detecció de melanomes (Pickel *et al.*, 2004).

- Detecció de microorganismes. La detecció de microorganismes, igual que la detecció de cèl·lules canceroses, és una especialitat molt recent i amb un elevat potencial de creixement. Actualment s'està treballant en la detecció de fongs (Kuske, 2005; Korpi *et al.*, 1998) i bacteris (Filipiak *et al.*, 2012), essent una de les principals aplicacions la detecció de fongs en ambients d'edificis (síndrome de l'edifici malalt) (Kauhanen *et al.*, 2002).

Revisió bibliogràfica referent als mètodes existents de producció de mostres oloroses de fongs i mètodes d'ensinistrament

Són poques les referències a mètodes de producció de mostres oloroses a partir de fongs o els mètodes d'ensinistrament que es fan servir, però les descrites actualment són:

- Esterilització amb autoclau. Aquest mètode consisteix en crear una suspensió del/s microorganisme/s en aigua estèril i esterilitzar-la mitjançant un tractament tèrmic per autoclau (121°C durant 45 minuts), realitzant tot el procediment en el contenidor final de la mostra per a conservar tots els components olorosos possibles (Bulanda, 2002). El líquid resultant es fa servir directament com a mostra olorosa, per exemple, amarant papers de filtre. És un mètode molt segur perquè el microorganisme està inactiu i el procés és simple, ràpid i poc costós. Quan a la capacitat d'emetre olors, l'elevada pressió i temperatura assolides per l'autoclau poden alterar les estructures proteiques i canviar-ne l'olor, el que ho converteix en un mètode poc fiable. Els autors d'aquest mètode no realitzen cap comprovació del grau de similitud mitjançant tècniques de separació i anàlisi químic.

- Presentació directa del microorganisme actiu. S'ha aplicat principalment en la detecció de fongs i bacteris alteradors de la fusta. S'han fet servir mostres de *Serpula lacrymans*, *Coniophora puteana* i *Antrodia sinuosa* sembrades directament en peces de fusta de pi; *Cladosporium herbarum*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium verrucosum* i *Aspergillus niger* en Agar Extracte de Malta; *Streptomyces* sp. en TYG (Kauhanen *et al.*, 2002). Durant l'entrenament les mostres cultivades en peces de fusta es presenten directament, mentre que les cultivades en plaques de Petri s'amaguen entre/sota peces de fusta no contaminada.
- Microorganisme viu a la placa de Petri. Existeix un sistema d'entrenament en el que es fan servir: medis de cultiu amb el microorganisme, mostres de material contaminat amb el microorganisme, cultius i mostres de material sense el microorganisme i mostres de materials que emeten components d'estructura similar als mVOC del microorganisme (Lorenz i Diedrich, 2001). Amb aquest sistema, el gos ha d'aprendre a discriminar l'olor del microorganisme de l'olor de la resta de material (placa de petri, components d'estructura química similar als MVOC, material no contaminat, etc.). Tant aquest sistema com l'anterior, on només varia el mètode d'ensinistrament, ofereixen una elevada qualitat olorosa, ja que es treballa amb el microorganisme viu. El procés és senzill però, d'altra banda, existeixen riscos importants i ofereixen una baixa seguretat tant pel gos com pels manipuladors de la mostra.

MÈTODES DE SEPARACIÓ I ANÀLISI QUÍMICA

Existeixen diverses tècniques per recollir els VOC tot i que principalment estan basades en l'ús de tubs d'absorció (Joblin *et al.*, 2010) o de fibres de microextracció en fase sòlida (SPME) (Bingley *et al.*, 2012).

Els mètodes de separació utilitzats habitualment són la cromatografia líquida (LC) i la gasosa (GC) (Joblin *et al.*, 2010; Nielsen, 2003). Quan als sistemes de detecció de VOCS descrits a la literatura, actualment es treballa amb espectròmetre de masses (MS) (Betancourt *et al.*, 2013), espectròmetres de mobilitat d'ions (IM-MS) (Hübert *et al.*, 2011), nassos electrònics (*e-nose*) (Kuske *et al.*, 2005) i TOF-MS (Wilhborg *et al.*, 2008).

El sistema utilitzat en aquest estudi per la determinació de VOCs ha estat l'acoblament de microextracció en fase sòlida, cromatografia de gasos i espectrometria de masses (SPME-GC-MS) (Figura 16).

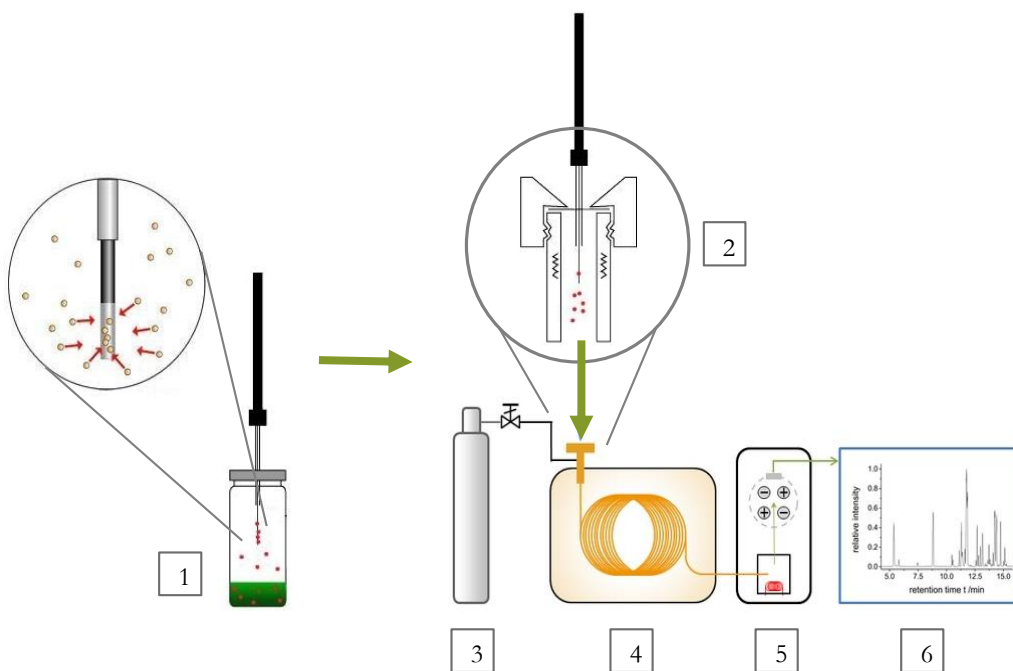


Figura 16. Representació de l'acoblament entre la fibra SPME, el GC i el MS. 1: microextracció en fase sòlida, 2: desorció dels compostos volàtils de la fibra, 3: gas transportador, 4: columna capil·lar per la separació dels VOCs, 5: espectròmetre de masses amb quadrupol, 6: programa informàtic que decodifica la informació generada amb el MS.

Determinació de VOCs mitjançant SPME-GC-MS

La microextracció en fase sòlida (*Solid-Phase Microextraction*, SPME) és un mètode senzill i efectiu de captura i concentració de compostos volàtils de l'espai de cap d'una mostra (Belardi i Pawliszyn, 1989). El funcionament del mètode es basa en assolir l'equilibri de compostos volàtils entre la fase líquida/sòlida de la mostra i el gas del *headspace* i, posteriorment, entre el gas del *headspace* i la fibra SPME. En el cas de mostres líquides, el temps necessari per assolir l'equilibri es pot reduir ajustant la temperatura i el pH, utilitzant agitació mecànica o afegint sals, com el NaCl (Eisert i Levsen, 1996).

La separació dels components amb cromatografia de gasos (GC) i detecció amb espectrometria de masses (MS) és un mètode analític combinat que permet identificar els components volàtils capturats i concentrats amb la fibra SPME. Actualment s'està utilitzant per analitzar compostos de baix pes molecular, sempre i quan siguin suficientment volàtils i tèrmicament estables, ja que el mètode utilitza temperatures de fins a 250 °C. Els compostos volàtils concentrats amb la fibra SPME són injectats al GC i vaporitzats cap a una columna capil·lar mitjançant un gas transportador (normalment, Heli). Els components de la mostra flueixen a través de la columna i són separats progressivament en funció de la seva afinitat per la fase estacionària de la columna i pel gas transportador (fase mòbil). A mesura que les molècules surten de la columna són ionitzades elèctricament (EI), procés pel qual perden un electró i es transformen en radicals catiónics (M^+).

L'espectròmetre de masses separa els M^+ en funció de les propietats de cada tipus d'aparell (quadropol, temps de vol, radio-freqüència, entre d'altres), essent el quadropol el més freqüentment utilitzat. Un cop s'han separat els ions, aquests entren en contacte amb un detector que amplifica la senyal i l'envia a un programa informàtic que integra tota la informació i converteix la senyal elèctrica en diferents gràfics i senyals visuals que classifiquen els components volàtils en funció del seu pes molecular. Degut a l'elevada energia despesa durant el procés de ionització, és normal

que els M^+ es fragmentin produint ions més petits amb una abundància relativa característica, el que ofereix una empremta pròpia per cada estructura molecular. Aquesta informació, un cop contrastada amb bases de dades online, és la que permet identificar els diferents components de la mostra.

OBJECTIUS I

PLA DE TREBALL

OBJECTIUS

Les hipòtesis plantejades en aquesta investigació són:

- Hipòtesi primera
 - **H₀**: Els gossos són capaços de detectar la presència de fongs filamentosos mitjançant l'olfacte.
 - **H₁**: Els gossos no són capaços de detectar la presència de fongs filamentosos mitjançant l'olfacte.
- Hipòtesi segona
 - **H₀**: És possible extreure el perfil de compostos orgànics volàtils d'un fong i fer-los servir per ensinistrar un gos per detectar la presència del fong.
 - **H₁**: No és possible extreure el perfil de compostos orgànics volàtils d'un fong i fer-los servir per ensinistrar un gos per detectar la presència del fong.

Per resoldre les hipòtesis anteriors, els objectius plantejats són, dividits en objectius principals i secundaris:

- Objectius principals. Referent a l'obtenció de mostres d'origen microbiològic per a l'ensinistrament específic d'unitats canines de biodetecció:
 - Determinar el millor mètode per a l'obtenció de les mostres.
 - Establir un protocol genèric de producció.
 - Desenvolupar un programa de treball genèric per demostrar que els fongs miceliats són detectables mitjançant l'olfacte caní.
- Objectius secundaris.
 - Publicar i divulgar els resultats.
 - Determinar la possible projecció de futur en el camp de l'agricultura.

PLA DE TREBALL

El desenvolupament d'aquesta tesi s'ha dividit en set fases seqüencials:

1. Revisió exhaustiva de bibliografia científica, estudi dels antecedents i dels fonaments teòrics necessaris pel desenvolupament de la investigació.
2. Determinació dels requisits que han de complir les mostres per ser totalment innòcues pel gos de treball, el guia caní, els manipuladors i el medi ambient.
3. Realització de diferents assajos *in vitro* per determinar el protocol d'elaboració de les mostres oloroses fent servir dues soques de *Penicillium rugulosum* i una de *Trichoderma viride* com a model fúngic. Aquests assajos inclouen: proves de cultiu i conservació, aplicació de tractaments físics, cultiu en sistemes de contenció alternatius i proves d'extracció dels VOC.
4. Elaboració de mostres reals de diferents fongs miceliats a partir dels resultats dels estudis *in vitro*.
5. Determinació de la presència de compostos orgànics volàtils d'origen fúngic a les mostres oloroses mitjançant tècniques de separació i anàlisi química.
6. Realització de proves de camp i ensinistrament de les UC de biodetecció.
7. Avaluació dels resultats i discussió

Les set fases anteriors es presenten estructurades i relacionades entre elles a l'esquema següent (Figura 17):

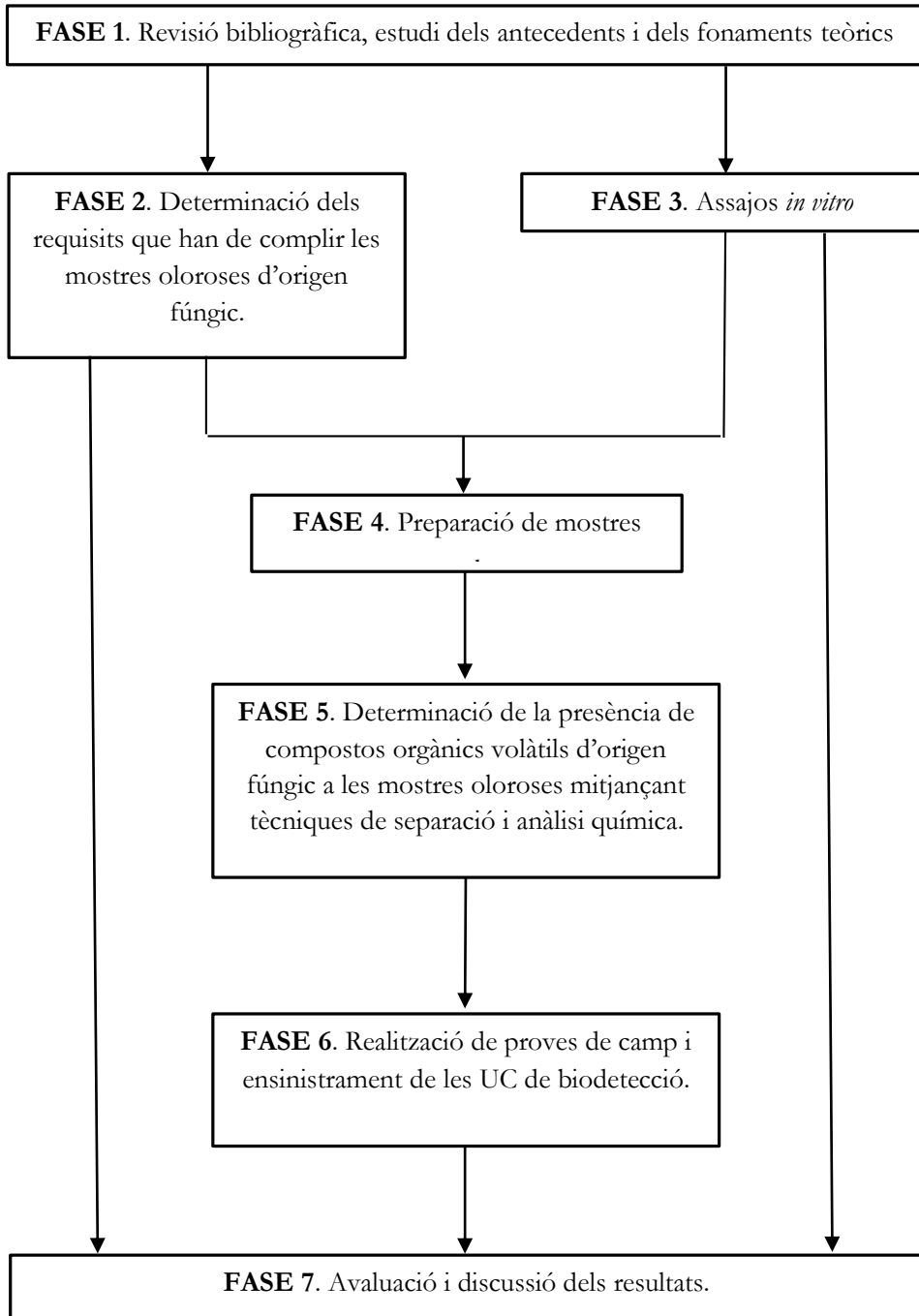


Figura 17. Esquema de les fases del pla de treball estructurades i relacionades entre sí.

MATERIALS I

MÈTODES

ASSAJOS PREVIS

Les tècniques que es podrien fer servir per l'elaboració de les mostres inclouen mètodes químics, físics i biotecnològics. Els mètodes químics es descarten perquè suposen la incorporació d'olors foranes a les mostres. D'altra banda, els mètodes biotecnològics són molt interessants perquè podrien permetre, per exemple, augmentar la producció de VOCs o reduir la patogenicitat d'una soca (reduint el risc pel gos). Tot i així, l'alteració de les soques pot tenir implicacions legals i costos econòmics que no s'adaptin a la filosofia d'aquesta tesi i, a més, podrien suposar una alteració substancial del perfil olorós del fong alterat.

Així, per cada microorganisme s'han de realitzar varis estudis per ajustar el protocol genèric i, en general, s'intenten aprofitar tractaments d'inactivació sinèrgics per evitar alterar l'olor de la mostra i s'estudiarà l'ordre òptim dels tractaments per reproduir l'olor de la forma més fiable possible. Els microorganismes model amb els quals es treballa, la justificació i el possible camp d'aplicació de la respectiva UC de biodetecció es resumeixen a continuació (Taula 3).

A la Figura 18 s'exposa un esquema representatiu dels passos i la metodologia que es seguiran al llarg de la investigació per a cada un dels microorganismes, que inclouen: aïllament, identificació i conservació del microorganisme, estudis de resistència a diferents tractaments (xoc osmòtic, xoc tèrmic, tractament amb ultrasons), estudi del perfil olorós (mitjançant GS-MS), producció de mostres, estudi de detecció amb gossos específicament ensinistrats i fase d'anàlisi i valoració dels resultats.

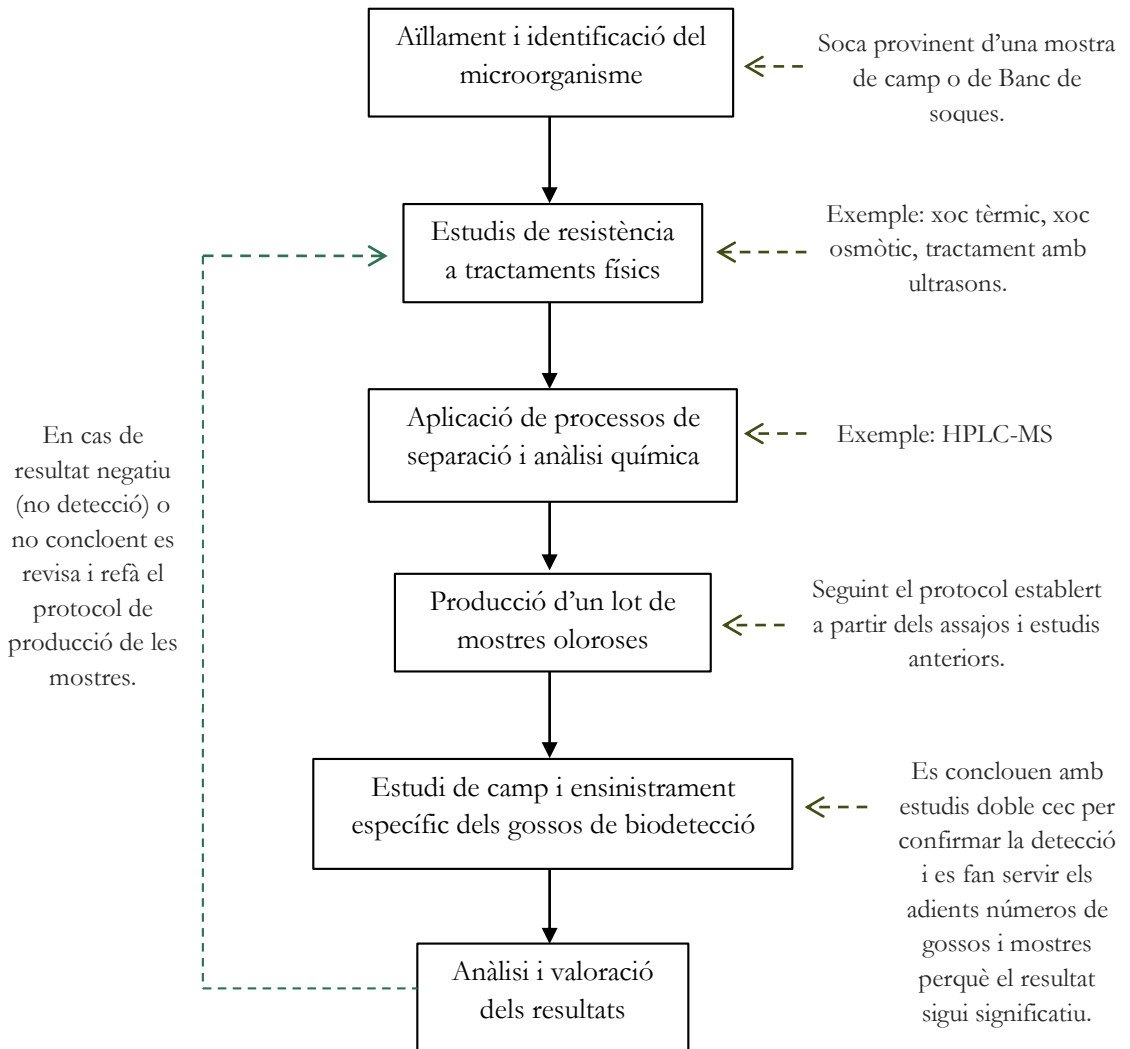


Figura 18. Esquema general de la metodologia de treball que es seguirà per cada microorganisme model.

Taula 3. Microorganismes model, justificació de la seva elecció i possible camp d'aplicació d'una UC operativa.

Microorganisme	Justificació	Camp d'aplicació
<i>Penicillium rugulosum</i>	Presenta una gran resistència als tractaments assajats en estudis previs. És un dels principals fongs indicadors de contaminació ambiental per fongs.	Agricultura (post-collita)
<i>Trichoderma viride</i>	El seu ús com a biofertilitzant ofereix la possibilitat de realitzar determinació de presència o absència en diferents períodes després de la seva aplicació. Presenta una olor característica que permetrà iniciar la fase d'ensinistrament (habitució progressiva del gos a les olors)	Agricultura (biofertilització)
<i>Verticillium dahliae</i>	És un dels principals fongs patògens en plantes ornamentals i oliveres, pel que ofereix una vessant pràctica important. El seu perfil olorós és el més subtil i permet conèixer el rendiment del pla d'ensinistrament.	Agricultura (pre-collita)

Cultiu i conservació *in vitro* de *Penicillium rugulosum*, *Trichoderma viride* i *Verticillium dahliae*

Dues soques de *Penicillium rugulosum* provinents d'un document antic que presenta les alteracions típiques produïdes per aquesta espècie en substrat cel·lulòsic són aïllades en una placa de Petri amb Agar Sabouraud amb antibiòtic (ASab+), que s'incuba durant 5 dies a una estufa de 28°C (Heraeus®). Posteriorment, es comprova la identitat de la soca mitjançant l'observació de les estructures reproductores a 1000 augments sota microscopi òptic (Olympus®). Les dues soques presenten un grau

d'esperulació clarament diferent i són identificades com a A i B, essent la A la de major esperulació.

Una soca de *Trichoderma viride* de la col·lecció de soques del Laboratori de Microbiologia Aplicada i Mediambiental de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona és aïllada i identificada sota les mateixes condicions que les dues soques de *Penicillium rugulosum*.

Una soca de *Verticillium dahliae* provinent del banc de soques ATCC i amb nombre de registre ATCC® 18698™ és reactivada i enriquida durant 24 h amb Agar Sabouraud líquid i, posteriorment, sembrada en medi Agar Sabouraud sòlid i incubada durant 6 dies a 28 °C. Un cop desenvolupat, es procedeix a realitzar la identificació macroscòpica i microscòpica del fong, seguint el mateix protocol que per *P. rugulosum* i *T. viride*.

La conservació de les soques es realitza fent re-sembres periòdiques (aproximadament, un cop cada 45 dies) en tubs de vidre amb Agar Sabouraud sòlid inclinat que es mantenen en refrigeració.

Tractaments físics aplicats a diferents soques de *Penicillium rugulosum* i *Trichoderma viride*

Com a primera proposta per obtenir aquest tipus de mostres oloroses s'han realitzat tractaments físics seriatos i de baixa intensitat, aconseguint la inactivació del fong però sense degradar-lo ni perdre els components olorosos. Els fongs que s'han fet servir com a model en aquest estudi són *Penicillium rugulosum* i *Trichoderma viride*, mentre que els tractaments aplicats són el xoc osmòtic, xoc tèrmic, tractament amb ultrasons i liofilització. Tant *P. rugulosum* com *T. viride* han estat escollits per presentar una olor característica que facilitaria l'ensinistrament del gos i per la possibilitat de

formar una UC de detecció de fongs alteradors del patrimoni històric documental i una UC de detecció de biofertilitzants, respectivament.

A continuació es presenten els materials i mètodes dels estudis de resistència a aquests tractaments pels fongs estudiats.

Obtenció de les suspensions de conidis

Els tractaments físics realitzats parteixen d'una suspensió de conidis en aigua destil·lada estèril a una concentració de 10^9 conidis per ml.

Xoc osmòtic

S'han realitzat dos tipus de xoc osmòtic, ambdós basats en un canvi bruscat de medi de cultiu o de tipus de solució de suspensió. El primer tipus consisteix en traspasar el fong des del medi de cultiu (ASab+) a un recipient amb 100 ml d'aigua destil·lada estèril mitjançant un hisop.

En el segon cas es passa el fong des del medi de cultiu (ASab+) a un recipient amb 50 ml de Lactat de Ringer per Eucariotes, es deixa reposar 30 minuts, es centrifuga a 3500 rpm durant 5 minuts, es retira el sobrenedant, es re-suspèn el dipòsit amb 100 ml d'aigua destil·lada i s'homogeneïtza amb l'agitador vòrtex (Nahita®).

Ultrasons

El tractament amb ultrasons (Branson Sonifier® Ultrasonic Cell Disruptor) es porta a terme amb suspensions de conidis i miceli en 100 ml d'aigua destil·lada estèril. Les variables que s'han considerat són el temps d'exposició (6, 8 i 10 minuts) i

la potència d'ultrasons aplicada (55 i 90 W). El cicle d'ultrasons és continu. S'assaja cada potència d'ultrasons per cada temps d'exposició.

Xoc tèrmic

L'assaig es porta a terme amb suspensions de conidis i miceli en 100 ml d'aigua destil·lada estèril fraccionades en alíquotes de 10 ml en recipients de vidre termo-resistents. El xoc tèrmic es realitza al llarg de 3, 5 i 8 minuts mitjançant la immersió dels recipients en un bany d'aigua (Raypa®) a 80 °C, 90 °C i 100 °C per cada temps d'exposició.

Disseny experimental

Es realitzen diferents assajos per determinar l'efecte de cada tractament físic sobre les tres soques aïllades. Posteriorment, es repeteixen les proves combinant tots els tractaments entre ells per conèixer si l'ordre en que es porten a terme i les intensitats són rellevants.

Les condicions de cada tractament són les citades prèviament, i en tots els casos es realitzen: dos controls positius abans de començar els assajos, dues sèries de control després de cada tractament i dues sèries al final de cada assaig. Es considera que un tractament és efectiu quan un cop aplicat s'inhibeix completament el creixement.

Cultiu en Eppendorf amb filtre per separació de DNA i en flascons de vidre

Com a sistemes de contenció alternatius dels fongs i que puguin ser útils durant l'ensinistrament, la soca B de *Penicillium rugulosum*, la soca de *Trichoderma viride* i la de *Verticillium daliae* són sembrades per duplicat en medi Agar Sabouraud amb antibiòtic que prèviament s'ha dipositat, sota condicions d'esterilitat, (1) en vials de vidre esmerilat amb tap de rosca i (2) en Eppendorfs amb filtre per extracció de DNA.

Un cop sembrats, els fongs són incubats a 28 °C durant 5 dies, seguint els protocols microbiològics habituals. Posteriorment, els contenidors es guarden a temperatura ambient i en refrigeració i es realitzen sembres periòdiques d'aquests cultius per determinar-ne la durabilitat.

Extracció de compostos orgànics volàtils en fase aquosa

Com a mètode d'extracció de compostos orgànics volàtils i que no afegeixi olors externes a l'extracte resultant, es realitza una extracció en fase aquosa. Aquest procediment no està descrit actualment a la bibliografia i consisteix en, sota condicions d'esterilitat:

1. Dipositar 7 ml d'aigua destil·lada estèril a la superfície dels cultius sembrats en plaques de Petri amb Agar Sabouraud.
2. Deixar reposar la placa durant 30 minuts, realitzant agitacions circulars cada 5 minuts.
3. Extreure el sobrenedant de la placa amb una xeringa.
4. Filtrar el contingut de la xeringa amb un filtre esterilitzant de 0.45 µm, dipositant l'extracte en el recipient definitiu (estèril).

5. Mitjançant un hisop, sembrar una placa de Petri amb Agar Sabouraud d'una mostra provinent de l'extracte i incubar a 28 °C durant 7 dies per confirmar la seva esterilitat.
6. Tancar hermèticament el recipient de l'extracte i conservar-lo en refrigeració.

ANÀLISI I SEPARACIÓ QUÍMICA DE COMPOSTOS ORGÀNICS VOLÀTILS

Preparació del patró intern

Com a patró intern s'ha fet servir 2-octanol (Sigma-Aldrich®) a concentració 0.01 g/ml per tal que la seva abundància, un cop afegit als extractes, sigui de 10 ppm.

Per evitar contaminar les mostres amb components no desitjats, la injecció del patró es realitza amb una xeringa de vidre (Hamilton®) de 10 µl que prèviament es renta 10 cops amb etanol absolut (Sigma-Aldrich®).

Preparació de les mostres

Les mostres es preparen en tubs d'assaig aptes per ser punxats amb la fibra SPME i tancades hermèticament fins el moment de l'anàlisi. Les mostres utilitzades han estat:

- Blancs (per duplicat):
 - o Aigua destil·lada estèril (4 ml) amb 1 g de NaCl i 5 µl de patró intern.

- Medi Agar Sabouraud sense antibiòtic (4 ml) i preparat inclinat en vials de vidre estèrils i segellats.
- Mostres (per duplicat):
 - Cultiu de *Penicillium rugulosum* (soca B) en Agar Sabouraud.
 - Extracte dels VOCs de *P. rugulosum* (4 ml) amb 1 g de NaCl i 5 µl de patró intern.
 - Cultiu de *Trichoderma viride* en Agar Sabouraud.
 - Extracte dels VOCs de *T. viride* (4 ml) amb 1 g de NaCl i 5 µl de patró intern.
 - Cultiu de *Verticillium dahliae* en Agar Sabouraud.
 - Extracte dels VOCs de *V. dahliae* (4 ml) amb 1 g de NaCl i 5 µl de patró intern.

Adsorció dels VOCS amb fibra SPME (*headspace*), separació per cromatografia i detecció amb espectròmetre de masses

Per l'adsorció dels VOC s'ha utilitzat una fibra SPME DVB/CAR/PDMS (*divinylbenzene/carboxen/poludimethylsiloxane*) de 50/30 µm de diàmetre i de 2 cm llarg de Supelco® (Bellefonte, PA). L'anàlisi dels VOC s'ha realitzat fent servir un cromatògraf de gasos acoblat a un espectròmetre de masses amb quadrupol Agilent 5973 Network® (Agilent Technologies, Palo Alto). Per la separació dels compostos s'ha fet servir una columna capil·lar Supelcowax-10® (Supelco) de 30 metres de llarg, 0.25 mm de diàmetre i 0.25 µm de diàmetre de fibra. El gas transportador utilitzat ha estat Heli i el seu flux durant l'anàlisi s'ha mantingut a 38 cm/segon.

Les condicions de temps i temperatura durant la separació dels VOC a la columna han estat: 60 °C durant 3 minuts, increment a 75 °C a un ritme de 4 °C/minut, increment a 250 °C a un ritme de 8 °C/minut. El temps i temperatura durant el procés

d'adsorció de VOC ha estat de 45 °C pels blancs d'Agar Sabouraud i els cultius de fongs i de 60 °C amb agitació a 700 rpm pels blancs d'aigua destil·lada estèril i pels diferents extractes en fase aquosa. El procés de desorció dels VOC s'ha realitzat a 250 °C durant 15 minuts.

El protocol de treball per a cada mostra ha estat, seguint les condicions anteriors:

1. Neteja de la fibra de SPME introduint-la en el port d'injecció del cromatògraf de gasos a 250 °C durant 30 minuts. La neteja de la fibra mitjançant aquest procés es realitza un cop per cada 4 mostres analitzades.
2. Temperar la mostra a temperatura ambient deixant-la en repòs 15 minuts al laboratori.
3. Punció de la mostra amb la fibra SPME.
4. Realitzar l'adsorció dels compostos volàtils del *headspace* de la mostra durant 30 minuts. Per mostrejar el *headspace* dels vials, la fibra de SPME és punxada al vial hermètic, on s'exterioritzen 10 mm de l'agulla de la cànula.
5. Un cop finalitzat el procés d'adsorció, l'agulla es reintrodueix dins la cànula i la fibra sencera s'extreu del vial. A continuació s'introdueix a l'injector del GC on es produeix la desorció i separació dels VOC.
6. Separació dels components amb cromatògraf de gasos i detecció amb l'espectròmetre de masses.

Anàlisi dels compostos detectats amb l'espectròmetre de masses

L'anàlisi dels compostos detectats per l'espectròmetre de masses es realitza manualment i per la seva identificació es fan servir les llibreries de referència NIST (*Nist Chemistry Web Book*) i Wiley (*Wiley Online Library*).

SELECCIÓ DEL GOS DE TREBALL

A continuació es presenten els criteris de selecció del gos de treball, el material i les proves a realitzar. La selecció parteix d'una línia externa de cria i es busquen gossos de protectores i donacions particulars. La possibilitat de treballar amb criadors o línies de cria específiques no és possible en aquest cas degut a les limitacions de temps i pressupost.

Criteris de selecció del gos de treball

Els principals criteris de selecció es divideixen en criteris morfològics, d'actitud, criteris específics de treball i criteris veterinaris. Tots aquests criteris, juntament amb els indicadors de selecció es presenten a la Taula 4.

Material per la selecció

El material necessari per realitzar les proves de selecció és:

- Collar de baules metàl·liques o de nylon en funció de l'actitud del gos.
- Corretja d'ensinistrament de 2 metres amb anelles i mosquetons.
- Corretja llarga de 6 a 10 metres.
- Reforços alimentaris (permetrà avaluar resposta al menjar i capacitat d'aprenentatge de l'obediència de base).
- Juguines variades (pilotes, mossegadors, cordes).
- Tests de plàstic, blocs formigó i materials similars (per poder-hi amagar juguines).

- Objectes per avaluar la capacitat de recuperar-se vers un estímul negatiu (una tapa d'escombraries de plàstic, un paraigües, etc.).

Taula 4. Criteris de selecció del gos de treball.

INDICADORS		
CRITERIS	FAVORABLES	DESFAVORABLES
Morfològics	<input type="checkbox"/> Gos de mida petita o mitjana <input type="checkbox"/> Pèl curt o dur <input type="checkbox"/> Aparença amistosa	<input type="checkbox"/> Gos de mida gran <input type="checkbox"/> Pèl llarg o llis <input type="checkbox"/> Aspecte agressiu
Actitud	<input type="checkbox"/> Calmada però atenta <input type="checkbox"/> Sense agressivitat cap a persones ni animals <input type="checkbox"/> Sense pors ni fòbies	<input type="checkbox"/> Excitable o apàtica <input type="checkbox"/> Amb agressivitat cap a persones i/o altres animals <input type="checkbox"/> Amb pors o fòbies
Específics de treball	<input type="checkbox"/> Elevada motivació pel joc <input type="checkbox"/> Bona capacitat de cerca i olfacte <input type="checkbox"/> Predisposició per l'aprenentatge <input type="checkbox"/> Resultats favorables a les proves de selecció	<input type="checkbox"/> Poca motivació pel joc <input type="checkbox"/> Poc interès per buscar <input type="checkbox"/> Poca motivació per aprendre <input type="checkbox"/> Resultats desfavorables en les proves de selecció
Veterinaris	<input type="checkbox"/> Sense problemes de mobilitat <input type="checkbox"/> Sense malalties degeneratives, cròniques ni doloroses	<input type="checkbox"/> Amb problemes de mobilitat o amb malalties degeneratives, cròniques o doloroses que dificultin el joc o que suposin una manca de benestar animal durant el treball

Entorn de treball durant la selecció

La selecció es porta a terme a l'entorn habitual del gos (recinte de la protectora, jardí/parc de passeig habitual si és una donació particular o un criador) sempre i quan es tracti d'un entorn controlat i tancat. Els gossos que obtinguin resultats favorables a les proves es portaran, posteriorment, a un segon entorn per repetir les proves més importants i determinants.

El segon entorn de treball segueix sent un entorn controlat i tancat però amb major diversitat d'estímuls, ja que és un entorn desconegut pel gos. Com a exemples, seria adient un jardí privat, unes instal·lacions d'*Agility*, un pàrquing, etc.

Proves a realitzar durant la selecció

A continuació es defineixen les proves que s'han de realitzar durant la selecció i els possibles resultats. Cal destacar que és gairebé impossible definir totes les possibles reaccions d'un gos, de forma que només es citen els resultats favorables i desfavorables i s'obvien les respostes intermèdies (Taula 5).

- Observació en els canils. L'observació en els canils permet avaluar els criteris morfològics i d'actitud que s'han esmentat anteriorment. L'observació es realitzarà en tres fases:
 - o Fase I. Observació des de certa distància, sense que el gos es fixi amb l'instructor.
 - o Fase II. Observació a un metre de distància però sense tocar la gàbia ni interactuar amb el gos.
 - o Fase III. Contacte i observació del gos a través de la gàbia, mantenint una actitud relaxada i amistosa.
- Motivació pel joc. És una de les proves de major importància considerant l'especialitat amb la que es vol treballar i és imprescindible que sigui favorable per seguir amb la selecció. Les proves que es realitzen i que s'han de superar successivament són:
 - o Determinació de l'interès pel joc. Es presenten varies joguines al gos per observar les seves preferències i l'interès pel joc.
 - o Interès per la recuperació de la joguina. Un cop seleccionada la joguina en funció de les preferències del gos, aquesta es llança per observar la seva reacció. La distància i dificultat per recuperar-la

augmenten progressivament fins a llançar-la on el gos no pugui veure-la.

- o Determinació de la capacitat de cerca i d'olfacte. Aquesta prova es repeteix varis cops, i consisteix en amagar la joguina en blocs de formigó, testos i materials similars. Els primers cops el gos ha de poder accedir a la joguina sense dificultat i ha de veure com s'amaga la joguina. La dificultat de la prova augmenta progressivament per observar si el gos està fent servir el sentit de l'olfacte i la seva motivació per buscar.
- Resposta a la manipulació. Es manipula el gos físicament per observar la seva reacció. Aquesta prova es pot combinar amb la resta, i si al gos li agrada el contacte físic es pot fer servir com a reforç positiu.
- Resposta a la crida. S'observa en la prova de recuperació de la joguina, i és important captar l'atenció del gos amb el to de veu i la postura corporal.
- Relació amb altres gossos i amb persones. Es treballa amb corretja d'ensinistrament o corretja llarga en funció de l'actitud del gos. També es pot treballar amb el gos deslligat si es tracta d'un ambient controlat, però amb precaució.
- Recuperació vers estímul negatiu. En un dels descansos i quan el gos està prop del guia, aquest obre ràpidament un paraigües o pica una mà contra algun objecte que faci soroll i que actuï com a estímul aversiu.
- Motivació pel menjar. És la darrera prova a realitzar, ja que el menjar sol ser un estímul molt fort que, alhora, permet acabar la prova de selecció amb un reforç positiu.

Taula 5. Proves a realitzar durant la selecció i indicadors favorables i desfavorables.

INDICADORS		
PROVA	FAVORABLES	DESFAVORABLES
Observació en els canils	<input type="checkbox"/> Criteris morfològics a favor <input type="checkbox"/> Criteris d'actitud a favor <input type="checkbox"/> Interès cap a les persones però sense sobreexcitació <input type="checkbox"/> Actiu però sense signes d'ansietat	<input type="checkbox"/> Criteris morfològics en contra <input type="checkbox"/> Criteris d'actitud en contra <input type="checkbox"/> Identificat com a raça potencialment perillosa <input type="checkbox"/> Presenta signes d'ansietat (estereotípies, lladrucs constants, etc.)
Motivació pel joc	<input type="checkbox"/> Alta motivació pel joc amb pilota o motivador <input type="checkbox"/> Elevat interès en recuperar la juguina, tant si la té a la vista com si no la pot veure <input type="checkbox"/> Cerca espontània amb l'olfacte quan la juguina no està a la vista <input type="checkbox"/> Capacitat de mantenir l'interès en el joc durant la major part de la prova	<input type="checkbox"/> Poca o cap motivació per les juguines i/o pel joc amb el guia <input type="checkbox"/> Poc interès en recuperar la juguina o interès només si la juguina està a la vista <input type="checkbox"/> Cerca visual en comptes d'olfactiva <input type="checkbox"/> Elevada frustració /desmotivació amb pèrdua de l'interès si no aconsegueix la juguina
Manipulació	<input type="checkbox"/> Demuestra interès pel contacte físic i busca la mà del guia. <input type="checkbox"/> Es pot fer servir una carícia com a reforç positiu <input type="checkbox"/> Es mostra relaxat durant la manipulació, sense realitzar excessives senyals de calma	<input type="checkbox"/> Rebutja el contacte amb la mà tot i mantenir una actitud amistosa i tocar punts poc sensibles <input type="checkbox"/> Una carícia no pot fer-se servir com a reforç positiu. <input type="checkbox"/> Realitza senyals de calma i es vol apartar del guia
Crida	<input type="checkbox"/> Respon a la crida durant el joc <input type="checkbox"/> Respon a la crida quan està passejant sense corretja o amb corretja llarga <input type="checkbox"/> Si respon a la crida, sí que ho fa quan captem la seva atenció mitjançant un to de veu alegre i una expressió corporal relaxada	<input type="checkbox"/> Ignora la crida del guia a l'hora de recuperar la juguina <input type="checkbox"/> Ignora la crida quan està passejant lliure o amb corretja llarga <input type="checkbox"/> No es capta la seva atenció mitjançant canvis en el to de veu o amb l'expressió corporal

Relació	<input type="checkbox"/> Mostra interès amistós cap als gossos i les persones <input type="checkbox"/> Es mostra relaxat davant altres gossos i amb una actitud amistosa <input type="checkbox"/> Confia amb les persones i interactua adequadament amb desconeguts ja siguin homes, dones adults, ancians o nens.	<input type="checkbox"/> Mostra signes d'agressivitat o por cap a altres gossos o cap a les persones <input type="checkbox"/> Rebutja el contacte amb altres gossos, manté una actitud molt ofensiva o defensiva <input type="checkbox"/> És desconfiat cap a les persones o mostra signes de por o agressivitat cap a ancians/nens/adults/homes/dones.
Recuperació	<input type="checkbox"/> Es recupera ràpidament de l'estímul aversiu i torna ràpidament a una actitud confiada <input type="checkbox"/> Es recupera a poc a poc però al final torna a una actitud relaxada	<input type="checkbox"/> No es recupera de l'estímul aversiu i perd la confiança cap al guia <input type="checkbox"/> Es recupera molt lentament de l'estímul i després es mostra molt prudent i realitza contínues senyals de calma (agafa por)
Menjar	<input type="checkbox"/> Motivació pel menjar però no més que pel joc. <input type="checkbox"/> El menjar es pot fer servir com a reforç positiu	<input type="checkbox"/> Poc interès pel menjar o interès excessiu (més que pel joc) <input type="checkbox"/> El menjar no es pot fer servir com a reforç positiu

ENSINISTRAMENT BÀSIC I ESPECÍFIC

Material necessari per l'ensinistrament

A més del material necessari per al correcte manteniment del gos (menjar, aigua, llit, bosses per recollir femtes, tractament antiparasitari, material específic pel transport, material específic per la higiene i morrió), per a l'ensinistrament és necessari:

- Arnés de treball
- Collar de nylon que es retirarà quan comenci l'ensinistrament específic
- Corretja d'ensinistrament de 2 metres amb anelles i mosquetons
- Corretja llarga de 6 a 10 metres

- Reforços alimentaris (per a l'obediència de base)
- Joguina específica (preferent pel gos)
- Tests de plàstic, blocs formigó i materials similars (per poder-hi amagar la juguina)
- Guants de nitril per a manipular les mostres i no contaminar l'entorn amb l'olor de l'instructor
- Mostres específiques
- Desinfectant amb alcohol
- Papers de filtre per amagar amb la mostra
- Pipetes Pasteur per extreure la mostra del vial
- Recipients de vidre per contenir el paper de filtre amagat
- Nevera portàtil en cas de d'entrenar en entorns reals
- Quadern de camp i bolígraf
- Material per fixar les mostres a l'entorn (cinta adhesiva, gomes elàstiques, etc.)

Entorn de treball durant l'ensinistrament

Es treballa en entorns controlats, ja siguin entorns d'entrenament com de treball real, ja que és una especialitat que sempre es treballa en espais interiors.

Metodologia de treball

La tècnica d'ensinistrament és en positiu, essent la juguina el reforç principal (utilitzat per reforçar la cerca), i les carícies, el to de veu i el menjar els reforços secundaris (per reforçar tasques no directament relacionades amb la cerca, com exercicis d'obediència de base).

Planificació de l'ensinistrament

El període del que es disposa per executar l'ensinistrament bàsic i específic, segons el disseny de les fases del programa de treball, és d'uns tres mesos i mig. Els principals exercicis que el gos ha d'aprendre a realitzar són:

- Obediència de base. Els principals exercicis d'obediència de base que s'han d'ensenyar són el *seu*, el *quiet* i el *vine*. El gos ha d'aprendre aquests exercicis durant la primera fase del cronograma (Introducció a la cerca mitjançant el joc), i es consolidarà al llarg de la resta de l'ensinistrament.
- Habitució a les condicions de treball. Habitució al material, al transport, als entorns i condicions de treball.
- Ensinistrament específic. Detecció i marcatge passiu d'una olor específica en diferents entorns de treballs reals.

Cronograma

Per facilitar l'enteniment del cronograma, es parteix de les següents consideracions:

- Es programen dues sessions diàries d'ensinistrament, matí i tarda, de dilluns a divendres, i una sessió el dissabte al matí. Així, els tres mesos i mig són equivalents a 84 dies d'ensinistrament.
- Per augmentar la consistència de les conductes que s'aprenen diàriament, les sessions de les tardes són una repetició de les sessions del matí amb l'objectiu de millorar les deficiències i potenciar els punts forts que s'han vist a la primera sessió.
- No s'avançarà amb l'ensinistrament si el gos no realitza correctament l'activitat programada amb un 90% de fiabilitat.

- En cas de produir-se un salt en l'aprenentatge i que el gos ofereixi espontàniament una conducta d'interès, s'intentarà capturar però no s'avançarà en la cronologia sinó que s'intentarà adaptar i seguir la planificació.

El cronograma (Taula 6) consta de 4 fases a desenvolupar en 84 dies d'ensinistrament: Introducció a la cerca mitjançant el joc (I), Ocultació combinada (II), Ocultació combinada operativa (III) i Ocultació operativa (IV).

Taula 6. Cronograma genèric per l'ensinistrament d'una UC de biodetecció.

FASE	DIES	ACTIVITAT
Introducció a la cerca mitjançant el joc	1-3	<input type="checkbox"/> Es juga a llançar i recuperar el motivador a la vista i en superfícies planes. <input type="checkbox"/> S'introdueixen el <i>seu</i> (que es convertirà en el marcatge passiu) i <i>vine</i> durant el joc. <input type="checkbox"/> Primer contacte amb les condicions de treball.
	4-6	<input type="checkbox"/> Es juga a llançar i recuperar el motivador a la vista i en superfícies irregulars (zones de bosc, pàrquings, etc.). <input type="checkbox"/> Es reforcen el <i>seu</i> i el <i>vine</i> i s'introdueix el <i>quiet</i> . <input type="checkbox"/> Comença l'habitució a nous entorns i a les condicions de treball.
	7-9	<input type="checkbox"/> Es juga a llançar i recuperar el motivador sense que estigui a la vista i en superfícies irregulars (zones de bosc, pàrquings, etc.). <input type="checkbox"/> Es reforça l'obediència de base durant la sessió. <input type="checkbox"/> Es segueix amb l'habitució a les condicions de treball.
	10-12	<input type="checkbox"/> Es juga a llançar i recuperar el motivador sense que estigui a la vista i en entorns variats, incrementant la dificultat per recuperar-lo progressivament. <input type="checkbox"/> S'introdueix el <i>seu</i> com a marcatge passiu a l'hora de recuperar el motivador. <input type="checkbox"/> Es reforça l'obediència de base. <input type="checkbox"/> Es segueix amb l'habitució a les condicions de treball.
Ocultació combinada	13-15	<input type="checkbox"/> Es realitza colonització odorant amb la mostra olfactiva, 1-2 cops, i després es juga a llançar i recuperar el motivador juntament amb la mostra olorosa a la vista i en superfícies planes. <input type="checkbox"/> Es continua reforçant el <i>seu</i> com a marcatge passiu, l'obediència de base i l'habitució a les condicions de treball.

Ocultació combinada (cont.)	16-18	<input type="checkbox"/> Es realitza colonització odorant amb la mostra olfactiva, 1-2 cops, i després es juga a llançar i recuperar el motivador juntament amb la mostra olorosa a la vista i en superfícies irregulars (zones de bosc, pàrquings, etc.). <input type="checkbox"/> Es continua reforçant el <i>seu</i> com a marcatge passiu, l'obediència de base i l'habitució a les condicions de treball.
	19-21	<input type="checkbox"/> Es realitza colonització odorant amb la mostra olfactiva, 1-2 cops, i després es juga a llançar i recuperar el motivador amb la mostra olorosa sense que estigui a la vista i en superfícies irregulars (zones de bosc, pàrquings, etc.). <input type="checkbox"/> Es continua reforçant el <i>seu</i> com a marcatge passiu, l'obediència de base i l'habitució a les condicions de treball.
	22-24	<input type="checkbox"/> Es realitza colonització odorant amb la mostra olfactiva, 1-2 cops, i després es juga a llançar i recuperar el motivador amb la mostra olorosa sense que estigui a la vista i en entorns variats, incrementant la dificultat per recuperar-lo progressivament. <input type="checkbox"/> Es continua reforçant el <i>seu</i> com a marcatge passiu, l'obediència de base i l'habitució a les condicions de treball.
Ocultació combinada operativa	25-35	<input type="checkbox"/> Es realitza colonització odorant amb la mostra olfactiva, 1-2 cops, i després s'amaga el motivador amb la mostra olorosa en <u>entorns reals de treball</u> però no necessàriament sobre el substrat en el que es trobaria en un operatiu real. <input type="checkbox"/> Habitució als nous entorns de treball reals <input type="checkbox"/> Es continua reforçant el <i>seu</i> com a marcatge passiu, l'obediència de base i l'habitució a les condicions de treball.
Ocultació operativa	51-61	<input type="checkbox"/> S'amaga la substància (sense el motivador) en els mateixos entorns reals on abans es realitzaven els exercicis. Es fa introducció olfactiva abans de començar a buscar. La substància s'amaga en entorns reals però no necessàriament sobre el substrat en el que es pot trobar en un operatiu. <input type="checkbox"/> Es continua reforçant el <i>seu</i> com a marcatge passiu, l'obediència de base i l'habitució a les condicions de treball.
	62-84	<input type="checkbox"/> Es realitza colonització odorant amb la mostra olfactiva només si es considera necessari. La mostra s'amaga en entorns reals de treball, però en aquesta fase a sobre els substrats en el que es pot trobar en un operatiu real. <input type="checkbox"/> Es consolida el <i>seu</i> com a marcatge passiu, l'obediència de base i l'habitució a les condicions de treball.

Mètodes d'avaluació del progrés

Durant els 84 dies d'ensinistrament es programa una petita avaluació diària, una setmanal i una avaluació mensual. Quan acaba el període d'ensinistrament es realitza l'avaluació final en la que s'analitzen tots els resultats i es planifica l'assaig formal per poder obtenir la sensibilitat i especificitat de detecció del gos.

Les avaluacions diàries, setmanals i mensuals han de servir de registre dels resultats de la selecció, l'evolució de l'ensinistrament, la qualitat del material, l'eficàcia dels mètodes i, alhora, han de permetre identificar noves necessitats i possibles carències del programa de treball.

ASSAIG FORMAL DELS GOSSOS ENSINISTRATS I ANÀLISI ESTADÍSTIC

Per realitzar l'anàlisi estadístic s'ha realitzat una cerca doble cega (l'instructor i l'avaluador no saben quines mostres són positives) amb 100 mostres oloroses positives i 100 mostres oloroses negatives. S'han realitzat 20 sessions en 20 dies consecutius en el que cada dia s'ofereixen 10 mostres, intercalant a l'atzar el total de positius i negatius. A partir d'aquests resultats, i seguint les fórmules de la Figura 19, es calcula l'especificitat i la sensibilitat de detecció de cada gos pel fong que s'ha ensinistrat.

Un cop determinada la sensibilitat i especificitat en la detecció de les mostres oloroses, es procedeix a preparar dilucions 1:2 seriadades de les mostres per determinar fins quin dilució de la mostra original és capaç de detectar el gos. Finalment, i prenent les precaucions necessàries, es realitzen 4 sessions de cerca d'un cultiu pur del fong (confinat en un Eppendorf amb filtre de sílica) en un espai controlat de 100 m², tancat i sense corrents d'aire.

En tot l'estudi formal, les respostes no concloents s'interpreten com a negatives. Les respostes no concloents són totes les respostes front la font d'olor en que el gos no s'asseu i mira fixament el punt d'emissió de l'olor.

$$\text{Sensibilitat} = \frac{\text{Positiu verdaders}}{\text{Positiu verdaders} + \text{Falsos positius}} \times 100$$
$$\text{Especificitat} = \frac{\text{Negatiu verdaders}}{\text{Negatiu verdaders} + \text{Falsos negatius}} \times 100$$

Figura 19. Fórmules utilitzades pel càlcul de l'especificitat i la sensibilitat.

PROCEDIMENTS DE PRECAUCIÓ I SEGURETAT

Les mostres han estat manipulades en tot moment amb guants de nitril i material d'un sol ús per evitar contaminar-les amb altres microorganismes o l'olor corporal del manipulador. Un cop fetes servir, les mostres i el material en contacte s'esterilitza amb autoclau per evitar la possible contaminació del medi ambient.

El gos és explorat mensualment per un veterinari i a l'exploració física dels tres primers mesos s'inclou una presa de mostres de la mucosa nasal mensual per detectar possibles canvis en la seva microbiota i una radiografia toràcica per detectar possibles micosis pulmonars. En cas de detectar patologia respiratòria i no observar canvis en la microbiota de la mucosa nasal ni en el patró radiogràfic pulmonar, es procediria a realitzar un rentat bronco-alveolar i cultiu microbiològic per descartar colonització fúngica a la laringe, la tràquea i els bronquis.

Recomptes de la microbiota de la mucosa nasal

Per tal de determinar si es produeixen canvis significatiu a la microbiota de la mucosa nasal dels gossos degut a l'exposició constant a les mostres oloroses es procedeix a realitzar una presa de mostres de la mucosa nasal dels tres gossos durant l'ensinistrament.

Les mostres són sembrades mitjançant els protocols microbiològics estandarditzats en els següents medis de cultiu i condicions d'incubació:

- Agar Sang (AS). A 37 °C amb condicions d'aerobiosi i anaerobiosi.
- Triptona – Soja – Agar (TSA). A 37 °C amb condicions d'aerobiosi i anaerobiosi.
- Man – Rogosa – Sharpe Agar (MRS). A 37 °C amb condicions d'aerobiosi, anaerobiosi i microaerofília amb un 5% de CO₂.
- Agar McConkey (MK). A 37 °C i 42 °C amb aerobiosi.
- Baird-Parker (BP). A 37 °C amb aerobiosi.
- Agar Sabouraud (AS). A 28 °C amb aerobiosi..

Determinació de l'evolució dels patrons radiogràfics toràcics

Per cada gos ensinistrat, es realitzen radiografies toràciques latero-laterals dretes dues setmanes abans de començar l'ensinistrament i al llarg del tercer mes d'ensinistrament per tal de detectar la presència de canvis en els patrons pulmonars.

RESULTATS

ASSAJOS PREVIS

Cultiu i conservació in vitro de *Penicillium rugulosum*, *Trichoderma viride* i *Verticillium dahliae*

La identificació microscòpica dels tres fongs, així com el seu creixement i conservació al laboratori han estat correctes.

Tractaments físics aplicats a diferents soques de *Penicillium rugulosum* i *Trichoderma viride*

A les Taula 7a i 7b s'observen els resultats obtinguts en els assajos per cada mètode, fong i soca. A la Taula 8 s'observa una comparació de l'efecte del xoc tèrmic amb i sense tractament previ amb ultrasons sobre el creixement de les diferents soques.

Taula 7a. Resultats del xoc osmòtic i tèrmic realitzats per cada soca. Efectes dels diferents tractaments a intensitats variables sobre el creixement de *Penicillium rugulosum* soca A (PRA), *Penicillium rugulosum* soca B (PRB) i *Trichoderma viride* (TV). Respecte els controls, la inhibició del creixement s'indica amb el signe "X"; una reducció del creixement s'indica amb "-"; un creixement normal s'indica amb "="; un augment del creixement s'indica amb "+". Wd: xoc osmòtic amb aigua destil·lada estèril. LRE: xoc osmòtic amb Lactar de Ringer per Eucariotes i aigua destil·lada estèril.

	Xoc osmòtic		Xoc tèrmic								
	Wd	LRE	3 minuts			5 minuts			8 minuts		
			80 °C	90 °C	100 °C	80 °C	90 °C	100 °C	80 °C	90 °C	100 °C
PRA	=	=	-	-	X	-	-	-	-	-	-
PRB	=	=	-	X	X	X	X	X	X	X	X
TV	=	=	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Taula 7b. Resultats del tractament amb ultrasons realitzat per cada soca. Efectes dels diferents tractaments a intensitats variables sobre el creixement de *Penicillium rugulosum* soca A (PRA), *Penicillium rugulosum* soca B (PRB) i *Trichoderma viride* (TV). Respecte els controls, la inhibició del creixement s'indica amb el signe "X"; una reducció del creixement s'indica amb "-"; un creixement normal s'indica amb "="; un augment del creixement s'indica amb "+".

	Ultrasons					
	6 minuts		8 minuts		10 minuts	
	55 W	90 W	55 W	90 W	55 W	90 W
PRA	+	+	+	+	=	-
PRB	+	+	+	+	=	-
TV	+	+	+	+	=	-

Taula 8. Taula comparativa del creixement de les dues soques de *P. rugulosum* (A i B) i de la soca de *T. viride* després d'un xoc tèrmic a 80 °C i 90 °C per un temps de 3 minuts amb i sense aplicació prèvia d'un tractament amb ultrasons durant 6 minuts amb una potència de 90 W. Respecte els controls, la inhibició del creixement s'indica amb el terme "X"; una reducció del creixement s'indica amb "-"; un creixement normal s'indica amb "="; un augment del creixement s'indica amb "+". Wd: xoc osmòtic amb aigua destil·lada estèril. LRE: xoc osmòtic amb Lactar de Ringer per Eucariotes i aigua destil·lada estèril.

	<i>P. rugulosum</i> (A)		<i>P. rugulosum</i> (B)		<i>T. viride</i>	
	Xoc tèrmic	Ultrasons + xoc tèrmic	Xoc tèrmic	Ultrasons + xoc tèrmic	Xoc tèrmic	Ultrasons + xoc tèrmic
80 °C	-	X	-	-	X	X
90 °C	-	X	-	-	X	X

Cultiu en Eppendorf amb filtre per separació de DNA i en flascons de vidre

El creixement en els dos sistemes de contenció alternatius ha estat normal i els tres fongs han estat viables posteriorment fins a 6 setmanes conservats en refrigeració. En el cas de conservar-se a temperatura ambient, són viables fins a 10 dies per esgotament del medi de cultiu.

Extracció de compostos orgànics volàtils en fase aquosa

La capacitat d'extracció de components volàtils mitjançant aquest sistema s'ha avaluat mitjançant SPME/GS/MS i els resultats són exposats a continuació.

Els controls realitzats als extractes han confirmat la seva esterilitat.

ANÀLISI I SEPARACIÓ QUÍMICA DE COMPOSTOS ORGÀNICS VOLÀTILS

Blancs

Els compostos volàtils detectats en les mostres d'aigua destil·lada estèril i d'Agar Sabouraud amb una especificitat superior al 90% apareixen detallats a les taules 9 i 10, respectivament.

Els components volàtils de l'aigua destil·lada estèril que també s'han detectat al blanc del medi de cultiu són:

- Cloroform
- Benzaldehyd
- Metoxi-fenil-oxima

D'aquests tres compostos, propis de l'aigua però que també es trobem al medi de cultiu, s'ha detectat metoxi-fenil-oxima als tres cultius, mentre que el benzaldehyd i el cloroform només s'han trobat al cultiu de *V. dahliae*.

D'altra banda, els components volàtils del medi de cultiu (Agar Sabouraud) que han estat detectats també en els cultius dels fongs han estat:

- 2-butanona (present en el cultiu de *T. viride* i *V. dahliae*)
- 2.4-dimetil-1-heptà (en el cultiu de *P. rugulosum*)
- 2-metil-butanal (en el cultiu de *V. dahliae*)
- 3-metil-butanal (en el cultiu de *P. rugulosum*, *T. viride* i *V. dahliae*)

Cap compost olorós propi del medi de cultiu ha estat detectat als extractes olorosos dels fongs, però sí que s'hi han detectat els components provinents de l'aigua (els mateixos que es detecten en el cultiu de cada fong).

Penicillium rugulosum

Els compostos volàtils detectats als cultius de *Penicillium rugulosum* apareixen a la taula 11, i els detectats en els extractes de *P. rugulosum* a la taula 12. A la taula 13 s'observa una comparativa de les àrees sota la corba dels components comuns als dos tipus de mostres. En totes les taules s'ha respectat la nomenclatura anglesa dels compostos.

En els cultius de *P. rugulosum* s'han identificat un total de 68 compostos volàtils, dels quals dos provenien del medi de cultiu i un de l'aigua. D'altra banda, als extractes olorosos s'han identificat 30 VOCs comuns amb el cultiu. Així, mitjançant el mètode d'extracció en fase aquosa s'han extret correctament el 46% dels VOCs del cultiu de *Penicillium rugulosum*.

Trichoderma viride

A la taula 14 apareixen els compostos volàtils detectats als cultius de *Trichoderma viride*, mentre que els dels extractes i la comparativa d'ambdós tipus de mostra es presenten a les taules 15 i 16, respectivament.

En els cultius de *T. viride* s'han identificat 42 compostos volàtils, dels quals un provenia de l'aigua i dos del medi de cultiu. Quan als extractes, s'ha detectat 19 dels 40 VOCs presents al cultiu, pel que en aquest cas s'ha extret el 49% dels VOCs.

Verticillium dahliae

Els resultats de la detecció dels compostos volàtils dels cultius i extractes de *Verticillium dahliae* es mostren a les taules 17 i 18. A la taula 19 apareix una comparativa dels compostos presents als dos tipus de mostres.

S'han identificat 43 VOCs als cultius de *V. dahliae*, dels quals 3 provenen de l'aigua i 3 del medi de cultiu. En els extractes s'han detectat 16 dels 37 VOCs propis del fong, pel que s'ha aconseguit extreure el 43% dels VOCs del cultiu.

Taula 9. Compostos detectats a l'aigua destil·lada estèril amb el temps de retenció i l'àrea sota la corba dels seus pics en el replicat 1 i 2, juntament amb el càlcul de l'àrea mitjana.

COMPOST	Aigua destil·lada estèril			
	TR	AREA 1	AREA 2	AREA MITJANA
<i>Chloroform</i>	9,84	10736637	2029818	6383227,5
<i>Methane, bromodichloro-</i>	12,696	2306712	961830	1634271
<i>2-pyridinecarboxylic acid, ethyl ester</i>	13,411	2000896	957183	1479039,5
<i>Methane, tribromo-</i>	17,597	3287059	7948574	5617816,5
<i>2-mercapto-4-phenylthiazole</i>	17,858	4981083	5920522	5450802,5
<i>Benzaldehyde</i>	18,845	4130162	2747532	3438847
<i>Oxime-, methoxy-phenyl</i>	21,076	72163872	35162000	53662936
<i>Thujopsene-I3</i>	26,472	3404322	838506	2121414
<i>Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-</i>	28,63	1483882	1010527	1247204,5
<i>Diethyl phtalate</i>	30,068	1988557	2168964	2078760,5

Taula 10. Compostos detectats a l'Agar Sabouraud estèril amb el temps de retenció i l'àrea sota la corba dels seus pics en el replicat 1 i 2, juntament amb el càlcul de l'àrea mitjana. Els compostos olorosos detectats a l'Agar Sabouraud però que són provinents de l'aigua amb la qual s'ha preparat el medi no apareixen en aquesta taula.

COMPOST	Agar Sabouraud			
	TR	AREA 1	AREA 2	AREA MITJANA
<i>2,4-dimethyl-1-heptene</i>	6,785	10285422	21863086	16074254
<i>Butanal, 2-methyl</i>	7,287	1252625	6077316	3664970,5
<i>2-butanone</i>	7,543	12565202	28648088	20606645
<i>Butanal, 3-methyl</i>	7,65	145268428	182974267	164121348
<i>2-furancarboxaldehyde</i>	17,879	5053529	30548177	17800853
<i>Benzeneacetaldehyde</i>	20,34	5796637	25583029	15689833

Taula 11. Compostos detectats als cultius de *Penicillium rugulosum*, juntament amb el seu temps de retenció, l'àrea sota la corba dels replicats i l'àrea mitjana.

COMPOST	Cultius de <i>Penicillium rugulosum</i>			
	TR	AREA 1	AREA 2	AREA MITJANA
<i>N-ethyl-1,3-dithioisindoline</i>	6,023	49139483	467825442	258482462,5
<i>Isopropyl alcohol</i>	7,983	2309167	6381847	4345507
<i>Nonane, 2,6-dimethyl-</i>	9,195	2517909	1360704	1939306,5

<i>2-butanol</i>	10,044	5254679	5830042	5542360,5
<i>Dichloroacetic acid, decyl ester</i>	10,42	1556891	1096827	1326859
<i>Butanoic acid, 2-methyl-, propyl ester</i>	10,551	290051	1253277	771664
<i>3-heptanone, 1-methyl</i>	10,975	2177135	205587	1191361
<i>Ethanone, 1-cyclopentyl</i>	11,43	1850857	1670116	1760486,5
<i>Butamide</i>	11,468	6553423	467985	3510704
<i>1-propanol, 2-methyl</i>	11,623	1357969	1644823	1501396
<i>1-undecene</i>	11,974	626980	400039	513509,5
<i>1-butanol</i>	12,75	724356	795912	760134
<i>Eicosane</i>	13,599	853525	318968	586246,5
<i>1-butanol, 2-methyl</i>	13,885	9134583	27945392	18539987,5
<i>1,5-pentanediol, 3-methyl-</i>	13,935	3236245	192622	1714433,5
<i>Undecane, 4,6-dimethyl</i>	14,048	1338514	1684723	1511618,5
<i>Pyrazine</i>	14,092	858624	896275	877449,5
<i>3-Octanone</i>	14,352	735205	725105	730155
<i>Hexadecane</i>	14,439	918690	894774	906732
<i>Dodecane, 2,6,11-trimethyl</i>	14,554	460900	380308	420604
<i>1-Undecene, 7-methyl</i>	14,68	1869453	1273248	1571350,5
<i>Cynamide, dibutyl</i>	14,983	1884733	1017544	1451138,5
<i>2-octanone</i>	15,047	2565161	1372977	1969069
<i>1-tridecane</i>	15,203	7618252	3342056	5480154
<i>Cyclohexanone,3-vinyl-3-methyl</i>	15,684	5333892	5582793	5458342,5
<i>6-methyl-5-hepten-2-one</i>	15,842	1699143	785765	1242454
<i>Cyclohexanone, 3-methyl</i>	15,995	2016291	568680	1292485,5
<i>11H-dibenzo[b,e][1,4]diazepin-11-one, 5,10-dihydro-5-[3-metylamino)propyl]-</i>	16,307	2314583	1673657	1994120
<i>Heneicosane</i>	16,543	2023181	727453	1375317
<i>Tetradecene</i>	16,838	32588466	20724334	26656400
<i>Benzene, 1,4-bis(1,1-dimethylethyl)</i>	16,9	913747	830587	872167
<i>Benzene, 1-methoxyl-3-methyl</i>	17,502	4273554	419981	2346767,5
<i>13H-dibenzo(a,i)carbazole</i>	17,792	2084526	729528	1407027
<i>1-Hexadecene</i>	18,281	49852540	59535892	54694216
<i>2-nonanol</i>	18,388	312284030	175992727	244138378,5
<i>9-eicosene</i>	18,512	30711752	2755250	16733501
<i>Cis-9-tetradecen-1-ol</i>	19,057	8293143	4122206	6207674,5
<i>Beta-elemene</i>	19,362	22130985	12918408	17524696,5
<i>2,4-pentanedione, 3-butyl-</i>	19,536	17470021	1135258	9302639,5
<i>1-hexadecene</i>	19,948	2664465	2616320	2640392,5
<i>3,4-dimethoxytoluene</i>	20,28	1758425	1692700	1725562,5
<i>Benzonitrile,3-hydroxy</i>	20,324	69232311	67644660	68438485,5
<i>Gamma-curcumene</i>	20,452	44331122	33116066	38723594

<i>Bicyclotridec-1-ene</i>	20,846	1900545	13146741	7523643
<i>1-hexadecene</i>	21,146	20196326	14180829	17188577,5
<i>1-13-tetradecadiene</i>	21,443	23413708	2866628	13140168
<i>Cyclododecyne</i>	21,96	76500024	79052088	77776056
<i>2,5-dimethoxytoluene</i>	22,022	6430891	22010585	14220738
<i>1-alpha-hydroxy-12-methoxy-19-nor-5,beta-podocarpa-3,8,11,13-tetraen-2-one</i>	22,179	24666879	14424480	19545679,5
<i>Butanoic acid, butyl ester</i>	22,65	2731320	1958878	2345099
<i>7-dicyanomethylene-7H-2-methoxy-9H-1,8-(1'-propen-1'-yl-3'-ylden)-benzo-cycloheptane</i>	22,756	60571267	35938390	48254828,5
<i>9,12-octadecadienoic, acid, methyl ester</i>	22,95	658248	844542	751395
<i>Phenol, 2-6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methyl-</i>	23,022	5011950	1948401	3480175,5
<i>Cyclohexanecarboxaldehyde, 4-(hydroximethyl)-</i>	23,446	2176775	1322662	1749718,5
<i>Benzenamine, 2-methyloxy-</i>	23,895	3666259	2578801	3122530
<i>Octane, 3,7-dimethyl-1-(2,5-xylyl)-</i>	24,416	14038849	7912259	10975554
<i>2,6-di(t-butyl)-4-hydroxy-4-methyl-2,5-cyclohexadien-1-one</i>	25,168	1034114	279761	656937,5
<i>2,4,6-octatrien-1-ol, 3,7-dimethyl-(E,E)-</i>	25,44	2047863	1334441	1691152
<i>Juniper camphor</i>	25,825	5198170	2984376	4091273
<i>trans-syn-tricyclo[7.3.0.0(2,6)]-8-dodecene</i>	26,296	6462301	3449533	4955917
<i>2,4-quinolinediol</i>	26,811	6158399	3357032	4757715,5
<i>Betaelemene</i>	27,791	4465257	2364202	3414729,5
<i>Propenamide, 2-cyano-3-(2,4,6-trimethylphenyl)-</i>	28,195	1807553	573326	1190439,5
<i>Azulene</i>	28,994	6015727	2790751	4403239
<i>1,2-Benzenedicarboxylic acid, diethyl ester</i>	30,059	8301950	2844307	5573128,5

Taula 12. Compostos volàtils detectats en els extractes de *Penicillium rugulosum*, juntament amb l'àrea sota la corba dels replicats i l'àrea mitjana.

COMPOST	Extractes de <i>Penicillium rugulosum</i>			
	TR	AREA 1	AREA 2	AREA MITJANA
<i>N-ethyl-1,3-dithioisindoline</i>	6,023	618492	615486	616989
<i>Isopropyl alcohol</i>	7,983	236740022	242992370	239866196
<i>Butanoic acid, 2-methyl-, propyl ester</i>	10,551	221453	620311	420882
<i>3-heptanone, 1-methyl</i>	10,975	1662801	1661719	1662260

<i>Ethanone, 1-cyclopentyl</i>	11,43	59483243	57243012	58363127,5
<i>1-butanol</i>	12,75	5731701	9467459	7599580
<i>Pyrazine</i>	14,092	3192154	4890164	4041159
<i>Hexadecane</i>	14,439	84804349	85467168	85135758,5
<i>2-octanone</i>	15,047	37963966	44303236	41133601
<i>1-tridecane</i>	15,203	15664712	10538513	13101612,5
<i>Cyclohexanone,3-vinyl-3-methyl</i>	15,684	24699257	1754831	13227044
<i>Cyclohexanone, 3-methyl</i>	15,995	1911289	31855205	16883247
<i>11H-Dibenzo[b,e][1,4]diazepin-11-one, 5,10-dihydro-5-[3-metylamino)propyl]-</i>	16,307	1874452	1948858	1911655
<i>1-hexadecene</i>	18,281	76770134	110997251	93883692,5
<i>2-nonanol</i>	18,388	360750	7148269	3754509,5
<i>9-eicosene</i>	18,512	537567	4014820	2276193,5
<i>3,4-dimethoxytoluene</i>	20,28	6793682	7293063	7043372,5
<i>Gamma-curcumene</i>	20,452	1738404	2486565	2112484,5
<i>Bicyclotridec-1-ene</i>	20,846	893291		446645,5
<i>1-13-tetradecadiene</i>	21,443	420894	6112582	3266738
<i>Butanoic acid, butyl ester</i>	22,65	3126244	3089405	3107824,5
<i>7-dicyanomethylene-7H-2-methoxy-9H-1,8-(1'-propen-1'-yl-3'-ylden)-benzo-cycloheptane</i>	22,756	481359	460299	470829
<i>9,12-octadecadienoic, acid, methyl ester</i>	22,95	2877387	4694438	3785912,5
<i>Phenol, 2-6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methyl-</i>	23,022	2177077	2431158	2304117,5
<i>Cyclohexanecarboxaldehyde, 4-(hydroximethyl)-</i>	23,446	2179190	2149346	2164268
<i>2,6-di(t-butyl)-4-hydroxy-4-methyl-2,5-cyclohexadien-1-one</i>	25,168	10838365	1078594	5958479,5
<i>Juniper camphor</i>	25,825	3025314	3265642	3145478
<i>Betaelemene</i>	27,791	704491		352245,5
<i>Propenamide, 2-cyano-3-(2,4,6-trimethylphenyl)-</i>	28,195	8678963	7612516	8145739,5
<i>1,2-Benzenedicarboxylic acid, diethyl ester</i>	30,059	4262680	4746590	4504635

Taula 13. Components comuns detectats en els cultius i extractes de *Penicillium rugulosum*, amb les àrees sota la corba dels replicats i les àrees mitjanès.

<i>Penicillium rugulosum</i>		Cultiu			Mostra		
COMPOST	TR	AREA 1	AREA 2	AREA MITJANA	AREA 1	AREA 2	AREA MITJANA
<i>N-ethyl-1,3-dithioisindoline</i>	6,023	49139483	467825442	258482462,5	618492	615486	616989
<i>Isopropyl alcohol</i>	7,983	2309167	6381847	4345507	236740022	242992370	239866196
<i>Butanoic acid, 2-methyl-, propyl ester</i>	10,551	290051	1253277	771664	221453	620311	420882
<i>3-heptanone, 1-methyl</i>	10,975	2177135	205587	1191361	1662801	1661719	1662260
<i>Ethanone, 1-cyclopentyl</i>	11,43	1850857	1670116	1760486,5	59483243	57243012	58363127,5
<i>1-butanol</i>	12,75	724356	795912	760134	5731701	9467459	7599580
<i>Pyrazine</i>	14,092	858624	896275	877449,5	3192154	4890164	4041159
<i>Hexadecane</i>	14,439	918690	894774	906732	84804349	85467168	85135758,5
<i>2-octanone</i>	15,047	2565161	1372977	1969069	37963966	44303236	41133601
<i>1-tridecane</i>	15,203	7618252	3342056	5480154	15664712	10538513	13101612,5
<i>Cyclohexanone,3-vinyl-3-methyl</i>	15,684	5333892	5582793	5458342,5	24699257	1754831	13227044
<i>Cyclohexanone, 3-methyl</i>	15,995	2016291	568680	1292485,5	1911289	31855205	16883247
<i>11H-Dibenzo[b,e][1,4]diazepin-11-one, 5,10-dihydro-5-[3-metylamino)propyl]-</i>	16,307	2314583	1673657	1994120	1874452	1948858	1911655
<i>1-hexadecene</i>	18,281	49852540	59535892	54694216	76770134	110997251	93883692,5
<i>1-pentadecene</i>	18,388	312284030	175992727	244138378,5	360750	7148269	3754509,5
<i>9-eicosene</i>	18,512	30711752	2755250	16733501	537567	4014820	2276193,5
<i>3,4-dimethoxytoluene</i>	20,28	1758425	1692700	1725562,5	6793682	7293063	7043372,5
<i>Gamma curcumene</i>	20,452	44331122	33116066	38723594	1738404	2486565	2112484,5
<i>Bicyclotridec-1-ene</i>	20,846	1900545	13146741	7523643	893291		446645,5
<i>1-13-Tetradecadiene</i>	21,443	23413708	2866628	13140168	420894	6112582	3266738

<i>Butanoic acid, butyl ester</i>	22,65	2731320	1958878	2345099	3126244	3089405	3107824,5
<i>7-dicyanomethylene-7H-2-methoxy-9H-1,8-(1'-propen-1'-yl-3'-ylden)-benzo-cycloheptane</i>	22,756	60571267	35938390	48254828,5	481359	460299	470829
<i>9,12-octadecadienoic, acid, methyl ester</i>	22,95	658248	844542	751395	2877387	4694438	3785912,5
<i>Phenol, 2-6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methyl-</i>	23,022	5011950	1948401	3480175,5	2177077	2431158	2304117,5
<i>Cyclohexanecarboxaldehyde, 4-(hydroximethyl)-</i>	23,446	2176775	1322662	1749718,5	2179190	2149346	2164268
<i>2,6-di(t-butyl)-4-hydroxy-4-methyl-2,5-cyclohexadien-1-one</i>	25,168	1034114	279761	656937,5	10838365	1078594	5958479,5
<i>Juniper camphor</i>	25,825	5198170	2984376	4091273	3025314	3265642	3145478
<i>Betaelemene</i>	27,791	4465257	2364202	3414729,5	704491		352245,5
<i>Propenamide, 2-cyano-3-(2,4,6-trimethylphenyl)-</i>	28,195	1807553	573326	1190439,5	8678963	7612516	8145739,5
<i>1,2-Benzenedicarboxylic acid, diethyl ester</i>	30,059	8301950	2844307	5573128,5	4262680	4746590	4504635

Taula 14. Compostos detectats als cultius de *Trichoderma viride*, juntament amb el seu temps de retenció, l'àrea sota la corba dels replicats i l'àrea mitjana.

COMPOST	Cultius de <i>Trichoderma viride</i>			
	TR	AREA 1	AREA 2	AREA MITJANA
<i>Carbon dioxide</i>	3,646	64959282	54560632	59759957
<i>Acetone</i>	5,722	7314556	8531418	7922987
<i>N-ethyl-1,3-dithioisindoline</i>	6,1	27381101	22255052	24818076,5
<i>2-hexen-2one</i>	7,525	4503460	6454643	5479051,5
<i>Ethyl alcohol</i>	7,973	38908019	48900188	43904103,5
<i>Nonane, 2-6-dimethyl</i>	9,223	1870943	1228384	1549663,5
<i>Acetic acid, 2-methylpropyl ester</i>	9,754	950175	1164666	1057420,5
<i>Decane</i>	10,999	614687	824141	719414
<i>Ethanone, 1-cyclopentyl-</i>	11,388	1692863	1158249	1425556
<i>1-propanol, 2-methyl</i>	11,553	21842414	38094470	29968442
<i>Isopentyl acetate</i>	11,959	2672764	5868232	4270498
<i>Dodecane, 2,6,10-trimethyl</i>	13,263	1459607	1453050	1456328,5
<i>Isoamylalcohol</i>	13,767	429917183	636877809	533397496
<i>Pyrazine</i>	14,001	2933041	1602024	2267532,5
<i>Propanoic acid, pentyl ester</i>	14,171	1861750	1958114	1909932
<i>3-octanone</i>	14,513	19571799	10257559	14914679
<i>Eicosane</i>	14,948	1195254	1258351	1226802,5
<i>Octanal</i>	15,109	1223105	1547469	1385287
<i>Methoxyacetic acid, dodecyl ester</i>	15,308	6269326	5736025	6002675,5
<i>Bacchotricuneatin c</i>	15,453	3094501	2717466	2905983,5
<i>Cyclobutane, 1, 2-diethyl</i>	16,011	2771175	6017476	4394325,5
<i>5-(p-aminophenyl)-4-(p-tolyl)-2-thiazolamine</i>	16,376	2336904	2207407	2272155,5
<i>3-octanol</i>	16,565	1325758	2337735	1831746,5
<i>1-octen-3-ol</i>	17,37	10049811	5738276	7894043,5
<i>N-acetyl-d-valine</i>	17,751	4267969	15719671	9993820
<i>1-hexadecanol</i>	18,68	5795893	7055450	6425671,5
<i>Linalool</i>	18,785	15113757	5462167	10287962
<i>Cyclooctane</i>	18,841	4793169	11913090	8353129,5
<i>5-octen-1-ol,(Z)</i>	19,61	3366789	4231976	3799382,5
<i>Benzoic acid, methy ester</i>	20,052	136457486	23832294	80144890
<i>9-decen-1-ol</i>	21,754	35977015	68413692	52195353,5
<i>6-methylthiol(1)benzothieno(2,3-c)quinoline</i>	22,496	1151071	2509450	1830260,5
<i>Benzene, ethanol</i>	22,85	960470	3140488	2050479
<i>Phenylethyl alcohol</i>	23,269	85348560	248784467	167066513,5
<i>Benzenepropanoic acid, -alpha.-(hydroxymino)</i>	23,623	1303051	1606847	1454949

<i>Phenol</i>	24,218	487963	692195	590079
<i>6-methyl-2-pyridinecarbaldehyde</i>	26,717	2472073	1038477	1755275
<i>Sandaracopimaradiene</i>	28,443	3346018	6830340	5088179
<i>Humulen</i>	28,89	1254862	1771700	1513281

Taula 15. Compostos volàtils detectats en els extractes de *Trichoderma viride*, juntament amb l'àrea sota la corba dels replicats i l'àrea mitjana.

COMPOST	Extractes de <i>Trichoderma viride</i>			
	TR	AREA 1	AREA 2	AREA MITJANA
<i>Carbon dioxide</i>	3,646	8000218	1333236	4666727
<i>Acetone</i>	5,722	477607	383962	430784,5
<i>N-ethyl-1,3-dithioisindoline</i>	6,1	27996351	24853086	26424718,5
<i>Ethyl alcohol</i>	7,973	14625705	6710826	10668265,5
<i>Pyrazine</i>	14,001	375997	3454410	1915203,5
<i>3-octanone</i>	14,513	1326524	13492807	7409665,5
<i>Methoxyacetic acid, dodecyl ester</i>	15,308	17555295	12208165	14881730
<i>3-octanol</i>	16,565	1333598	1920195	1626896,5
<i>1-octen-3-ol</i>	17,37	71548885	61126706	66337795,5
<i>N-acetyl-d-valine</i>	17,751	5326124	6290488	5808306
<i>Linalool</i>	18,785	1222610	118273	670441,5
<i>Cyclooctane</i>	18,841	4194016	5383715	4788865,5
<i>5-octen-1-ol, (Z)</i>	19,61	1866054	2573577	2219815,5
<i>Benzoic acid, methy ester</i>	20,052	2407078	2246263	2326670,5
<i>9-decen-1-ol</i>	21,754	1508299	3663230	2585764,5
<i>Benzene, ethanol</i>	22,85	1279759	1343835	1311797
<i>Benzenepropanoic acid, -alpha.- (hydroxymino)</i>	23,623	1193371	1338298	1265834,5
<i>Phenol</i>	24,218	285411	329195	307303
<i>Sandaracopimaradiene</i>	28,443	1777081	1429556	1603318,5

Taula 16. Components comuns detectats en els cultius i extractes de *Trichoderma viride*, amb les àrees sota la corba dels replicats i les àrees mitjanes.

<i>Trichoderma viride</i>	Cultiu				Mostres		
COMPOST	TR	AREA 1	AREA 2	AREA MITJANA	AREA 1	AREA 2	AREA MITJANA
<i>Carbon dioxide</i>	3,646	64959282	54560632	59759957	8000218	1333236	4666727
<i>Acetone</i>	5,722	7314556	8531418	7922987	477607	383962	430784,5
<i>N-ethyl-1,3-dithioisindoline</i>	6,1	27381101	22255052	24818076,5	27996351	24853086	26424718,5
<i>Ethyl alcohol</i>	7,973	38908019	48900188	43904103,5	14625705	6710826	10668265,5
<i>Pyrazine</i>	14,001	2933041	1602024	2267532,5	375997	3454410	1915203,5
<i>3-octanone</i>	14,513	19571799	10257559	14914679	1326524	13492807	7409665,5
<i>Methoxyacetic acid, dodecyl ester</i>	15,308	6269326	5736025	6002675,5	17555295	12208165	14881730
<i>3-octanol</i>	16,565	1325758	2337735	1831746,5	1333598	1920195	1626896,5
<i>1-octen-3-ol</i>	17,37	10049811	5738276	7894043,5	71548885	61126706	66337795,5
<i>N-acetyl-d-valine</i>	17,751	4267969	15719671	9993820	5326124	6290488	5808306
<i>Linalool</i>	18,785	15113757	5462167	10287962	1222610	118273	670441,5
<i>Cyclooctane</i>	18,841	4793169	11913090	8353129,5	4194016	5383715	4788865,5
<i>5-octen-1-ol,(Z)</i>	19,61	3366789	4231976	3799382,5	1866054	2573577	2219815,5
<i>Benzoic acid, methy ester</i>	20,052	13645748 6	23832294	80144890	2407078	2246263	2326670,5
<i>9-decen-1-ol</i>	21,754	35977015	68413692	52195353,5	1508299	3663230	2585764,5
<i>Benzene, ethanol</i>	22,85	960470	3140488	2050479	1279759	1343835	1311797
<i>Benzenepropanoic acid, -alpha.- (hydroxymino)</i>	23,623	1303051	1606847	1454949	1193371	1338298	1265834,5
<i>Phenol</i>	24,218	487963	692195	590079	285411	329195	307303
<i>Sandaracopimaradiene</i>	28,443	3346018	6830340	5088179	1777081	1429556	1603318,5

Taula 17. Compostos detectats als cultius de *Verticillium dahliae*, juntament amb el seu temps de retenció, l'àrea sota la corba dels replicats i l'àrea mitjana.

COMPOSTOS	Cultiu de <i>Verticillium dahliae</i>			
	TR	AREA 1	AREA 2	AREA MITJANA
Acetone	5,739	11996921	15845810	13921365,5
Isopropyl alcohol	7,824	2069372	2487674	2278523
Ethyl alcohol	7,986	23303261	25572799	24438030
Dimethylsulfide	11,135	7767815	9892566	8830190,5
N-hexanal	11,267	2859621	2913445	2886533
1-propanol, 2-methyl-	11,558	16654260	18694096	17674178
Ethylbenzene	12,128	2987796	3632510	3310153
2,3-hexanedione	12,219	963265	1412598	1187931,5
Butanoic acid, 3-methyl-, 2-methylpropyl ester	13,262	3625524	5299002	4462263
Limonene	13,426	2060130	1561854	1810992
2-methylbutan-1-ol	13,682	131992596	158460295	145226445,5
Pyrazine	13,971	1099661	1243123	1171392
1-pentanol	14,403	1711960	1807664	1759812
Butanoic acid 3-methyl-, 2-methylbutyl ester	14,871	1776787	10323550	6050168,5
Isoamylisovalerate	15,101	21648081	20452651	21050366
Pyrazine, 2,5-dimethyl-	15,809	4839577	4891951	4865764
6-methyl-5-hepten-2-one	15,919	1807498	2699749	2253623,5
1H-pyrazole, 3-ethyl-4,5-dihydro-furan, 2-methoxy-	16,965	35816949	45290683	40553816
4-(diethylaminomethyl)-2,5-dimethylphenol	17,224	2092820	1639140	1865980
Heptanol	17,531	9825428	11028583	10427005,5
7-octen-2-ol, 2,6 dimethyl	17,62	10242164	9700177	9971170,5
1-hexanol, 2-ethyl-	17,939	9169884	8700101	8934992,5
Linalool	18,698	1379959	1322732	1351345,5
Neomenthol	20,049	11789544	11099192	11444368
Ethanone, 1-phenyl	20,467	5783054	5589978	5686516
5-(p-aminophenyl)-4-(O-tolyl)-2-thiazolamine	21,571	2248812	1165634	1707223
o,o',p-trichloroanisole	22,37	4172577	5023055	4597816
Butylated hydroxytoluene	23,162	85984959	73160426	79572692,5
Benzeneethanol	23,271	20128198	19286284	19707241
11H-dibenzo[b,e][1,4]diazepin-11-one, 5-(3-aminopropyl)-5,10-dihydro	23,672	9936427	9750776	9843601,5
Phenol	24,219	1533984	1514984	1524484
9-amino-7-mercapto-5,6,8,10-tetraaza-benzo[b]fluoren-11-one	24,611	9614507	7981177	8797842

<i>2,6-di(t-butyl)-4-hydroxy-4-methyl-2,5-cyclohexadien-1-one</i>	25,168	9225432	14713979	11969705,5
<i>1-(2,6-dimethyl-4-propoxy-phenyl)-2-methyl-propan-1-one</i>	25,58	1554321	1538039	1546180
<i>Phenol, 2-(1,1-dimethyl)-5-methyl-</i>	26,983	4722137	5774889	5248513
<i>1,2-benzenedicarboxylic acid, diethyl ester</i>	30,056	14584923	21790480	18187701,5

Taula 18. Compostos volàtils detectats en els extractes de *Verticillium dahliae*, juntament amb l'àrea sota la corba dels replicats i l'àrea mitjana.

COMPOSTOS	Extractes de <i>Verticillium dahliae</i>			
	TR	AREA 1	AREA 2	AREA MITJANA
<i>Acetone</i>	5,739	1709887	2916160	2313023,5
<i>Ethyl alcohol</i>	7,986	158801417	184017292	171409354,5
<i>Pyrazine, 2,5-dimethyl-</i>	15,809	1836511	14138992	7987751,5
<i>Heptanol</i>	17,531	22567389	27441312	25004350,5
<i>1-hexanol, 2-ethyl-</i>	17,939	4399614	4367663	4383638,5
<i>Linalool</i>	18,698	1381696	3124161	2252928,5
<i>Neomenthol</i>	20,049	5462919	6337848	5900383,5
<i>Ethanone, 1-phenyl</i>	20,467	3148372	2698000	2923186
<i>5-(p-aminophenyl)-4-(O-tolyl)-2-thiazolamine</i>	21,571	1553471	1454292	1503881,5
<i>Butylated hydroxytoluene</i>	23,162	4324316	4334033	4329174,5
<i>Benzeneethanol</i>	23,271	2873392	3745797	3309594,5
<i>11H-dibenzo[b,e][1,4]diazepin-11-one, 5-(3-aminopropyl)-5,10-dihydro</i>	23,672	5234619	2356728	3795673,5
<i>Phenol</i>	24,219	3548248	3745797	3647022,5
<i>Phenol, 2-(1,1-dimethyl)-5-methyl-</i>	26,983	2361852	3997298	3179575
<i>1,2-benzenedicarboxylic acid, diethyl ester</i>	30,056	28168428	17935441	23051934,5

Taula 19. Components comuns detectats en els cultius i extractes de *Verticillium dahliae*, amb les àrees sota la corba dels replicats i les àrees mitjanes.

<i>Verticillium dahliae</i>	Cultiu				Mostra		
COMPOSTOS	TR	AREA 1	AREA 2	AREA MITJANA	AREA 1	AREA 2	AREA MITJANA
Acetone	5,739	11996921	15845810	13921365,5	1709887	2916160	2313023,5
Ethyl alcohol	7,986	23303261	25572799	24438030	158801417	184017292	171409354,5
Pyrazine, 2,5-dimethyl-	15,809	4839577	4891951	4865764	1836511	14138992	7987751,5
Heptanol	17,531	9825428	11028583	10427005,5	22567389	27441312	25004350,5
1-hexanol, 2-ethyl-	17,939	9169884	8700101	8934992,5	4399614	4367663	4383638,5
Linalool	18,698	1379959	1322732	1351345,5	1381696	3124161	2252928,5
Neomenthol	20,049	11789544	11099192	11444368	5462919	6337848	5900383,5
Ethanone, 1-phenyl	20,467	5783054	5589978	5686516	3148372	2698000	2923186
5-(p-aminophenyl)-4-(O-tolyl)-2-thiazolamine	21,571	2248812	1165634	1707223	1553471	1454292	1503881,5
Butylated hydroxytoluene	23,162	85984959	73160426	79572692,5	4324316	4334033	4329174,5
Benzeneethanol	23,271	20128198	19286284	19707241	2873392	3745797	3309594,5
11H-dibenzo[b,e][1,4]diazepin-11-one, 5-(3-aminopropyl)-5,10-dihydro	23,672	9936427	9750776	9843601,5	5234619	2356728	3795673,5
Phenol	24,219	1533984	1514984	1524484	3548248	3745797	3647022,5
Phenol, 2-(1,1-dimethyl)-5-methyl-	26,983	4722137	5774889	5248513	2361852	3997298	3179575
1,2-benzenedicarboxylic acid, diethyl ester	30,056	14584923	21790480	18187701,5	28168428	17935441	23051934,5

SELECCIÓ I ENSINISTRAMENT DEL GOS DE TREBALL

Els criteris, material, entorn y proves de selecció han estat correctes i ha permès seleccionar tres gossos per l'ensinistrament, les característiques dels quals apareixen a la taula 20 i les seves corresponents fotografies a la Figura 20.

Taula 20. Resultats de les proves de selecció.

	<i>Penicillium rugulosum</i>	<i>Trichoderma viride</i>	<i>Verticillium dahliae</i>
Nom	Jara	Dana	Tuc
Sexe	Femella	Femella	Masclé
Raça	Pastor Belga	Beagle	Mestís
Pes	36 kg	12 kg	39 kg
Mida	Gran	Mitjà	Gran
Edat a l'inici de l'ensinistrament	18 mesos	14 mesos	18 mesos
Esterilització	Sí	Sí	Sí
Exploració física general	Correcta	Correcta	Correcta
Patologies detectades o conegudes	No	No	No
Indiferència a persones durant el treball	5/5	5/5	4/5
Indiferència a animals durant el treball	3/5	4/5	4/5
Indiferència a estímuls adversos	4/5	3/5	4/5
Motivació	5/5	4/5	4/5
Recuperació d'objectes (general)	5/5	5/5	5/5
Recuperació d'objectes (olfacte)	5/5	5/5	4/5

Els resultats dels mètodes d'ensinistrament es veuen reflectits a l'apartat següent: “Assaig formal dels gossos ensinistrats i anàlisi estadístic”.



Figura 20. Gossos seleccionats per l'ensinistrament. D'esquerra a dreta: Jara, Dana i Tuc.

ASSAIG FORMAL DELS GOSSOS ENSINISTRATS I ANÀLISI ESTADÍSTIC

Els resultats del test formal es mostren a la Taula 21. Aquests resultants, en que es computen els veritables positius i negatius i els falsos positius i negatius, serveix per calcular posteriorment l'especificitat i la sensibilitat de cada gos per cada fong.

Taula 21. Resultats del còmput total de veritables positius i negatius i falsos positius i negatius per a cada gos i fong.

TIPUS DE MOSTRA	INDICACIÓ DEL GOS	<i>Penicillium rugulosum</i>	<i>Trichoderma viride</i>	<i>Verticillium dahliae</i>
Mostres positives (n=100)	Positiva	98	94	95
	Negativa	0	1	0
	Dubtosa	2	5	5
Mostres negatives (n=100)	Positiva	6	6	5
	Negativa	94	92	91
	Dubtosa	0	2	4

Els resultats d'especificitat i sensibilitat apareixen a la Taula 22. En els tres casos la sensibilitat de detecció és superior al 94%, mentre que l'especificitat és superior al 90%. El llindar de cada dilució de la mostra original que és capaç de detectar cada gos per cada fong apareix a la Taula 23.

Taula 22. Resultats del càlcul de la sensibilitat i especificitat per a cada gos i fong.

	<i>Penicillium rugulosum</i>	<i>Trichoderma viride</i>	<i>Verticillium dahliae</i>
Sensibilitat	98%	94%	95%
Especificitat	94%	92%	91%

Taula 23. Dilucions (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64) que ha estat capaç de detectar cada gos per cada fong.

	Dilucions						
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
<i>Penicillium rugulosum</i>	X	X	X	X			
<i>Trichoderma viride</i>	X	X	X	X			
<i>Verticillium dahliae</i>	X	X	X				

El temps que triga cada gos en localitzar el fong en un espai de 100 m² mitjançant cerca lliure guiada es mostra a la Taula 24, especificant-se el temps de recerca per 4 situacions diferents. El temps mínim ha estat de 1.5 minuts, i el màxim de 4.5 minuts.

Taula 24. Temps (en minuts) i expressat en fraccions de 0.5 minuts que triga cada gos en localitzar el fong en un espai de 100 m² mitjançant cerca lliure guiada, en 4 situacions diferents.

	Temps (min) en 100 m ²									
	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5
<i>Penicillium rugulosum</i>			X	X		X	X			
<i>Trichoderma viride</i>				X		X	X	X		
<i>Verticillium dahliae</i>					X		X	X	X	

PROCEDIMENTS DE PRECAUCIÓ I SEGURETAT

Recomptes de la microbiota de la mucosa nasal

A la Taula 25 s'expressen els resultats dels recomptes de la microbiota de la mucosa nasal pels tres gossos ensinistrats i pel gos control, així com el resultat de la identificació dels fongs aïllats.

Determinació de l'evolució dels patrons radiogràfics toràcics

No hi ha hagut canvis en els patrons radiogràfics toràcics de cap dels tres gossos ensinistrats. A mode d'exemple, a la Figura 21 apareix una imatge radiogràfica

d'un dels gossos 2 setmanes abans de començar l'ensinistrament i als 3 mesos d'ensinistrament.

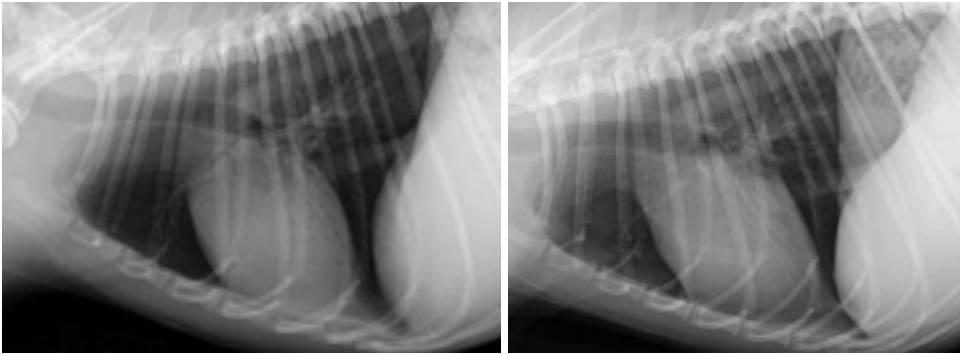


Figura 21. Radiografia toràica latero-lateral dreta a les 2 setmanes abans d'iniciar l'ensinistrament (esquerre) i radiografia toràica latero-lateral esquerra als tres mesos d'ensinistrament (dreta).

Taula 25. Recomptes dels microorganismes presents a la mucosa nasal dels tres gossos ensinistrats (gos B per buscar *Penicillium rugulosum*, gos C per *Trichoderma viride*, gos D per *Verticillium dahliae*) respecte el gos control (A) i resultat de la identificació dels fongs aïllats (AS: Agar Sang, TSA: Agar Triptona – Soja – Agar, MRS: Agar Man – Rogosa – Sharpe, BP: Agar Baird – Parker, MK: Agar McConkey, S+: Agar Sabouraud amb antibiòtic; Ae: Aerobiosi, An: Anaerobiosi, 5% CO₂: Microaerofília amb un 5% de CO₂).

MEDIS DE CULTIU I CONDICIONS	GOS A (Control)	GOS B (<i>P. rugulosum</i>)	GOS C (<i>T. viride</i>)	GOS D (<i>V. dahliae</i>)
AS, Ae, 37 °C	> 100.000 No hemolítiques	> 100.000 No hemolítiques	> 100.000 No hemolítiques	> 100.000 No hemolítiques
AS, An, 37 °C	> 100.000 No hemolítiques	> 100.000 No hemolítiques	92 No hemolítiques	250 No hemolítiques
TSA, Ae, 37 °C	3280	3344	336	250
TSA, An, 37 °C	> 100.000	> 100.000	<10	<10
MRS, Ae, 37 °C	<10	<10	<10	<10
MRS, An, 37 °C	>100.000	<10	<10	<10
MRS, 5% CO₂, 37 °C	<10	>100.000	<10	<10
BP, Ae, 37 °C	4280	3616	<10	<10
MK, Ae, 37 °C	<10	<10	<10	<10
MK, Ae, 42 °C	<10	<10	<10	<10
S+, Ae, 28 °C	<10 (3)	<10 (5)	<10 (1)	>10
Fongs aïllats	<i>Cladosporium berbarum</i>	<i>Cladosporium berbarum</i> , <i>Fusarium moniliforme</i>	<i>Cladosporium berbarum</i>	

DISCUSSIÓ

ASSAJOS PREVIS

Tractaments físics aplicats a diferents soques de *Penicillium rugulosum* i *Trichoderma viride*

El xoc osmòtic per sí sol no ha permès inhibir ni reduir el creixement de *Penicillium rugulosum* ni de *Trichoderma viride*, tal i com exposen també Klimek-Ochab *et al.*, (2011). És probable que la presència de la paret cel·lular, que contribueix a mantenir l'estabilitat del fong, també el protegeixi davant aquest efecte.

Un xoc tèrmic de més de 90 °C durant 3 minuts permet la inactivació dels conidis de *T. viride* i de la soca de *P. rugulosum* que presenta menor grau d' esporulació i, dels tres mètodes assajats, és el que aconsegueix reduir amb major mesura la viabilitat de les soques. Referent a la soca de *P. rugulosum* amb més esporulació, la seva inactivació amb calor s'obté un cop és exposada a un bany d'aigua a 100 °C durant 3 minuts o a 90 °C durant 5 minuts. El diferent efecte resultant de la combinació de diferents paràmetres de temps i temperatura s'ha descrit anteriorment i per tal d'aprofitar les combinacions òptimes, per exemple, durant els processos de pasteurització dels aliments (Sant'ana *et al.*, 2009).

El tractament amb ultrasons a temps d'exposició de 6 i 8 minuts i potència de 55 i 90 W donen com a resultat un major creixement aparent un cop es sembla una mostra de la solució. Aquest efecte possiblement es deu a que, amb aquests paràmetres, els ultrasons són capaços de trencar l'estructura fúngica però no de destruir la majoria dels conidis, de manera que aquests es disgreguen i ofereixen un creixement més dispers; un efecte similar ha estat descrit per Luo, Schmid, Grbin i Jiranek (2012) en el llevat *Zygosaccharomyces bailii*. D'altra banda, amb 10 minuts d'exposició a 55 W el creixement és aparentment normal i a 90W es redueix però sense que hi hagi una inhibició completa respecte els controls. Aquest últim efecte es deu, probablement, a

que a major temps i potència es destrueixen més conidis però alhora la dispersió és major.

La resistència dels conidis al tractament amb ultrasons pot ser avantatjosa, tal i com exposen Morris *et al.* (1998), per realitzar estudis de poblacions fúngiques en biofilms en diferents substrats ja que permet trencar el biofilm sense inhibir el posterior creixement del fong.

Referent a la combinació de tractaments físics, s'ha observat que el xoc osmòtic és pràcticament irrellevant en el procés d'inactivació dels conidis independentment de en quin moment s'apliqui. La combinació del xoc tèrmic amb el xoc osmòtic és rellevant només quan es realitza primer el tractament amb ultrasons i, posteriorment, el xoc tèrmic. Aquest fet possiblement és degut a que els ultrasons desestabilitzen la membrana cel·lular i faciliten l'efecte del xoc tèrmic. El procés a la inversa (primer xoc tèrmic i després ultrasons) no permet obtenir efectes significatius.

El conjunt de tractaments físics estudiats finalment no s'apliquen durant l'elaboració de les mostres utilitzades durant l'ensinistrament perquè els compostos orgànics volàtils desapareixen a mesura que s'altera el fong. A més, els VOCs restants procedirien, en tot cas, d'un fong inactivat mentre que mitjançant els mètodes proposats posteriorment (cultiu en Eppendorf amb filtre per separació de DNA i extracció de VOCs en fase aquosa) s'obtenen compostos propis del fong viu i en diferents fases de creixement.

Cultiu en Eppendorf amb filtre per separació de DNA i en flascons de vidre

Els Eppendorfs amb filtre per separació de DNA incorporen una membrana de sílica amb porus de 0,45 µm de diàmetre. Aquesta mida de porus permet que el fong pugui desenvolupar-se i respirar a l'interior de l'Eppendorf, així com que

s'alliberin VOCs cap a l'exterior del contenidor alhora que impedeix la dispersió dels seus conidis. Aquest sistema de contenció, senzill i econòmic, permet treballar amb el fong viu en fases avançades de l'ensinistrament, quan el gos és capaç de reconèixer l'olor específic de les mostres oloroses i s'ha de realitzar el salt cap a l'olor de l'organisme viu i en diferents fases de creixement. En cas d'utilitzar el fong viu durant l'ensinistrament és important destacar que, un cop el fong esgota el medi de cultiu i mor, l'Eppendorf s'ha d'eliminar d'acord amb la normativa de gestió de Residus Sanitaris Tipus III (subcategoria I: Residus Sanitaris Infecciosos).

Els flascons de vidre també permeten treballar amb l'olor emesa pel fong viu, tot i que en aquest cas no s'incorpora cap mètode de contenció i no es recomana utilitzar-lo durant els ensinistraments. No obstant, sí que seria possible utilitzar cultius confinats en flascons de vidre per preparar mostres fora del laboratori mitjançant el sistema d'extracció en fase aquosa. Aquesta opció és interessant a l'hora de realitzar demostracions i exhibicions amb el gos, que són tasques que s'han de fer sovint amb les Unitats Canines de treball per fer-ne difusió i potenciar la seva aplicació en diferents sectors.

Extracció de compostos orgànics volàtils en fase aquosa

L'ús d'una font d'olor fiable, real i segura ofereix importants avantatges respecte l'ús del microorganisme viu, destacant: (1) la seguretat pel gos, l'instructor, l'educador caní i el medi ambient; (2) l'homogeneïtat de l'olor al llarg del temps i entre lots de mostres; (3) la vida útil llarga i la conservació senzilla, amb la possibilitat de realitzar escalat industrial si és necessari; (4) es redueix el risc de contaminació amb altres olors o microorganismes; i (5) és possible fer servir les mostres per desenvolupar detectors electrònics si es realitza una determinació prèvia dels VOCs principals mitjançant HPLC-MS.

L'èxit d'extracció de VOCs específics (és a dir, procedents del fong, no de l'aigua ni del medi de cultiu) mitjançant aquest mètode ha estat del 43% en el cas de *Verticillium dahliae*, 46% per *Penicillium rugulosum* i 49% per *Trichoderma viride*. En els tres casos, els VOCs captats a les mostres són els que presenten un major temps de retenció a la cromatografia de gasos, com per exemple els terpens i sesquiterpens, essent habitualment els compostos aromàtics característics del fong. Aquest percentatge d'èxit, tot i que pugui semblar reduït, ha suposat una gran avantatge durant l'ensinistrament.

Quan un gos és ensinistrat per detectar restes humanes i/o cadàvers en tombes clandestines o determinats narcòtics i explosius, com per exemple l'heroïna i el perclorat, la normativa vigent de l'Estat Espanyol determina que només els Cossos i Forces de Seguretat poden treballar amb drogues i explosius reals, mentre que l'ús de restes humanes és exclusiu de la Policia Nacional i la Guardia Civil. Així, en aquests casos és habitual l'ús de pseudo-olors, que són olors sintètiques que mimetitzen els compostos volàtils emesos per les substàncies reals. Les pseudo-olors sempre contenen un perfil olorós més senzill que la substància real i així, per exemple, la pseudo-olor per l'ensinistrament de gossos per detectar cadàvers desenvolupat per Sigma Aldrich® (Sigma Pseudo™ *Corpse Scent*) incorpora un màxim de 33 molècules volàtils, de les quals 7 mimetitzen l'olor de l'adipocera, la putrescina i la cadaverina (Caldwell *et al.*, 2009; Stadler *et al.*, 2012).

Aquest mètode “simplificat”, utilitzat per l'ensinistrament de la majoria de gossos detectors a l'actualitat, permet agilitzar el procés pel qual el gos reconeix l'olor degut a que ha de identificar un menor nombre de molècules volàtils, el que augmenta la seva capacitat de discriminació, essent efectiu sempre i quan es treballi amb els volàtils *core* de la substància.

Aquest mètode ha evitat que compostos olorosos propis del medi de cultiu (com per exemple, la 2-butanona o el 2-furanocarboxaldehid) hagin contaminat les mostres (probablement degut al propi agar del medi, que reté la majoria de volàtils, i al fong, que si creix en massa evita en gran mesura el contacte de l'aigua amb el medi

de cultiu quan es realitza l'extracció). D'altra banda, els compostos volàtils provinents de l'aigua i que han estat detectats a les mostres (cloroform, benzaldehyd i metoxi-fenil-oxima) no són rellevants durant l'ensinistrament, ja que són elements ubiqüitaris que el gos discrimina fàcilment mitjançant un procés d'habitació natural als estímuls quotidians. Referent a aquests tres compostos detectats a l'aigua, el cloroform és un trihalometà generat durant el procés de potabilització de l'aigua, la concentració del qual està regulada pel Reial Decret 1400/2003; el benzaldehyd és un producte aromàtic que sovint s'incorpora a productes de neteja i la metoxi-fenil-oxima és un producte volàtil derivat dels plàstics, pel que aquests dos darrers compostos poden provenir del material utilitzat durant la producció de les mostres.

ANÀLISI I SEPARACIÓ QUÍMICA DE COMPOSTOS ORGÀNICS VOLÀTILS

La fibra SPME DVB/CAR/PMS, escollida per ser capaç d'adsorbir compostos aromàtics, volàtils i semi-volàtils amb un pes molecular de 40 - 275 DA, ha permès determinar que el nombre de VOCs presents en els cultius de *Verticillium dahliae*, *Penicillium rugulosum* i *Trichoderma viride* és superior a 140. Un cop filtrats els resultats, el nombre de VOCs estudiats ha estat d'entre 40 i 60 per cada fong i s'hi inclouen: hidrocarburs (p. ex. heptà), hidrocarburs aromàtics (p. ex. benzè), alcohols (p. ex. 1-octen-3-ol), aldehids, cetones, àcids orgànics, èters i èsters (p. ex. 2-octanona, 1-octen-3-ona), terpens i sesquiterpens (p. ex. limonèn, humulèn) i compostos orgànics de sofre o de nitrogen

Els resultats obtinguts pels diferents cultius demostren que el cromatògraf ha estat capaç de separar correctament una gran seqüència de VOCs. En primer lloc, i amb un temps de retenció menor, s'elueixen els compostos de baix pes molecular (àcid acètic i diòxid de carboni, per exemple) i, posteriorment, els alcohols de cadenes llargues, els aldehids i les cetones (3-octanol, 3-octanona, 2-dodecanona). A

continuació s'elueixen els hidrocarburs de cadena llarga (hexadecà), àcids de cadenes mitges (àcid heptanoic), terpens i sesquiterpens i, finalment, a major temps de retenció, les amines, amides i àcids orgànics de cadena llarga. Aquest ordre ve determinat per les propietats de la columna, així com per la temperatura a la qual s'ha treballat.

Alguns dels VOCs són comuns entre les tres espècies de fongs, tot i que el perfil de components emesos per cada fong s'observa clarament diferent no només en el tipus de VOCs sinó també amb la quantitat produïda.

A la literatura s'han descrit un grup de VOCs, anomenats Complex de VOCs C₈, que són comuns entre la majoria de gèneres de fongs i que són indicadors de que el fong està creixent activament (Fiedler *et al.*, 2001). Entre aquests VOCs, destaquen: 1-octen-3-ona, 1-octen-3-ol, 3-octanona, 1-octen-3-ol, entre d'altres, i formarien un grup de VOCs adients per ensinistrar una UC en la detecció de varis gèneres de fongs (Demyttenaere *et al.*, 2003). La detecció del complex C₈ mitjançant detectors electrònics s'està fent servir actualment en la detecció de les floridures dels edificis per diferenciar formes actives i inactives dels fongs (Bingley *et al.*, 2012). Tot i així, cal destacar que en el metabolisme fúngic existeixen vies enzimàtiques alternatives a les que donen com a resultat el Complex C₈ i que acaben formant compostos diferents com la 2-hexanona o la 2-heptanona (Wilkins *et al.*, 2000). Altres VOCs comuns entre els tres gèneres que s'han detectat no pertanyen al Complex C₈ perquè la seva estructura no està formada per 8 àtoms de carboni, com el 2-butanol, el 1-butanol, el 1-propanolol, el fenol i l'acetona.

Alguns dels VOCs produïts específicament per cada fong tenen interès comercial i aquests podrien convertir-se en una interessant font de producció. La detecció mitjançant SPME-GC-MS pot suposar un mètode ràpid de *screening* de cultius de fongs en cas de realitzar una recerca de compostos concrets o per determinar el perfil de molècules oloroses produïdes per cada gènere o espècie. Els fongs, igual que els bacteris, presenten característiques molt interessants quan es fan servir com a productors de metabòlits d'ús industrial com poden ser l'elevada taxa de creixement i la facilitat de purificació dels metabòlits. No obstant, els bioreactors de fongs

filamentosos requereixen d'un manteniment i reposició periòdics per evitar les turbulències i obstruccions provocades per l'acumulació d'hifes. Alguns exemples de molècules detectades amb interès industrial són: l'azulè (pigment), la tiazolamina (antifúngic), la càmfora Juniper (compost aromàtic utilitzat en perfumeria) i el mentol (molècula utilitzada a la indústria farmacèutica).

DETECCIÓ DE MICROORGANISMES AMB UNITATS CANINES

L'assaig formal, en el que es mesuraven diferents paràmetres quan a la velocitat, sensibilitat i especificitat de detecció, ha permès avaluar de forma objectiva la capacitat dels gossos per detectar les mostres produïdes per cada espècie de fong.

La sensibilitat, que permet conèixer el percentatge de cops que quan la mostra és positiva el gos realment realitza un marcatge, oscil·la entre el 94% i el 98%. L'elevat percentatge d'èxit en la detecció d'un positiu ve determinada per la motivació del gos per obtenir el seu reforç quan localitza l'olor diana, pel que difícilment deixarà de realitzar un marcatge si realment està detectant el fong. Conèixer la sensibilitat del gos permet estimar, en un mostreig real, la quantitat de falsos negatius que realitzarà (és a dir, quants focus d'olor no senyalitzarà).

L'especificitat permet determinar en quin percentatge de mostres negatives el gos no realitza cap tipus de marcatge i permet realitzar una aproximació a la quantitat de falsos positius que realitzarà en un operatiu (quants cops realitzarà un marcatge positiu quan realment no hi hagi el fong a l'ambient). Els resultats d'especificitat han estat del 91-94%, en tots els casos inferiors a la sensibilitat. Aquest resultat es pot deure en gran mesura a que, si durant l'assaig el gos no troba cap mostra positiva i no es presenta la possibilitat de realitzar un marcatge i obtenir el reforç positiu (menjar, pilota, etc.), pot intentar "enganyar" a l'ensinistrador i fingir un resultat positiu.

El temps de detecció d'un cultiu pur confinat en un Eppendorf amb filtre de sílica ha estat d'entre 1.5 i 4.5 minuts, depenent de cada gos i assaig. Aquest assaig ofereix un temps de detecció reduït, tot i que cal destacar que l'espai en el que s'ha realitzat era diàfan i amb poc mobiliari, el que facilita el treball del gos. No obstant, el guia que dirigia el gos desconeixia la ubicació de la mostra i, en un operatiu, sempre es defineixen "punts calents" (on és més probable que hi hagi l'element a detectar) i es realitza una cerca més focalitzada.

Finalment, els gossos ensinistrats per detectar *Penicillium rugulosum* i *Trichoderma viride* han estat capaços de reconèixer les mostres a una dilució 1:8, mentre que el gos ensinistrat per detectar *Verticillium dahliae*, a 1:4. Al llarg de tot el seu ensinistrament els instructors han treballat amb la mínima quantitat possible de mostra (normalment 5-10 gotes de la mostra, obtingudes amb una pipeta Pasteur), pel que els gossos s'habituen a reconèixer la mínima concentració de volàtils que els hi és possible.

Unitat canina per la detecció de *Penicillium rugulosum*

En diferents estudis s'ha demostrat que *Penicillium rugulosum* és una de les primeres espècies de fongs que creix en un ambient contaminat amb una elevada càrrega de conidis fúngics quan les condicions ambientals (temperatura, humitat, presència de nutrients, etc.) són òptimes (Zielinska-Jankiewicz *et al.*, 2008). Aquesta característica, que es manté independentment del tipus d'ambient, permet que *Penicillium rugulosum* actui com a fong indicador de que les condicions i maneig ambientals són deficientes i que, per tant, existeix un elevat risc de contaminació per fongs. En el cas de la conservació de vegetals, una determinació precoç d'aquestes característiques permet corregir ràpidament les condicions d'emmagatzematge, evitar que es desenvolupin alteracions de la qualitat i que creixin gèneres de fongs productors de micotoxines.

Aquests tipus de *screening* de l'entorn es pot realitzar mitjançant mètodes microbiològics tradicionals. Tot i així, la majoria de magatzems prefereixen determinar directament la presència dels fongs causants de les alteracions i patologies mitjançant l'observació directa dels símptomes (resposta reactiva) o realitzant determinacions preventives de presència – absència de fongs (en general). Aquest últim mètode, que forma part dels sistemes APPCC de les empreses distribuïdores, suposa un elevat cost econòmic, triga mínim 6 dies si es realitza mitjançant tècniques tradicionals i pot suposar el decomis d'una part de la producció si es detecta colonització per fongs.

D'altra banda, l'ús d'una UC ensinistrada específicament en la detecció de *Penicillium rugulosum* a l'ambient i utilitzada de forma rutinària permetria determinar de forma ràpida i focalitzada les condicions deficientes de maneig i emmagatzematge de fruites, verdures i hortalisses, evitant així el creixement d'espècies alteradores o patògenes. Aquest mètode no només permetria detectar errors en la manipulació de l'ambient sinó també determinar l'efectivitat d'altres mètodes de conservació que s'han citat al llarg de la introducció (tractaments pre-collita, tractaments post-collita i recol·lecció en el mínim climatèric), reduint globalment les pèrdues econòmiques i incrementant la taxa de comercialització d'aliments.

La UC de detecció de *P. rugulosum* s'ha ensinistrat en entorns controlats i són necessàries futures proves de camp per determinar la viabilitat de la seva implantació. Tot i així, considerant la velocitat en que el gos és capaç de trobar un cultiu pur en una àrea delimitada, aquesta UC oferiria característiques molt competitives en diferents sectors econòmics a part del sector agrícola, entre els que destaca la conservació del patrimoni documental.

La conservació del patrimoni documental és una funció essencial dels arxius municipals, recollida en la legislació i reconeguda en totes les publicacions especialitzades. Segons dades de la Diputació de Barcelona, l'alteració del patrimoni històric pels microorganismes és una de les tres causes més importants de desastres en els arxius de l'àrea Mediterrània, juntament amb les inundacions i els incendis (alhora

que aquests últims, degut als canvis en la humitat de l'ambient, acaben propiciant l'aparició de més microorganismes).

La composició dels diferents materials que es troben a biblioteques i arxius determina que siguin un substrat adient pel desenvolupament de diversos tipus de fongs i bacteris. La presència d'aquests microorganismes pot originar alteracions i destruccions en el substrat (llibres, fotografies, quadres, cassetes, vinils, etc.), tant perquè l'utilitzin com a font de nutrició com perquè hi elaborin i acumulin metabòlits secundaris, i possibles problemes en les persones que estiguin en contacte amb els substrats alterats. Tots els microorganismes que afecten als materials orgànics poden afectar a les personals i causar problemes en mucoses, vies respiratòries i alteracions dermatològiques i digestives, pel que s'han de prendre les màximes precaucions a l'hora de manipular el material contaminat i el millor mètode de prevenció es basa en la detecció precoç i eradicació.

Un cop instaurats els microorganismes en un ambient específic, i molt especialment els fongs, la seva eradicació és llarga i difícil. Per això, les principals mesures de prevenció actuals consisteixen en mantenir les condicions del medi ambient en paràmetres que no siguin favorables pel desenvolupament d'aquests microorganismes i, en aquest sentit, és fonamental controlar la temperatura i humitat relativa de l'ambient. Dins el grup de microorganismes alteradors del patrimoni, *Penicillium rugulosum* és un dels fongs que s'han detectat majoritàriament fins a dia d'avui (Calvo *et al.* 2006).

Actualment, un cop detectada una alteració es realitza un mostreig del document infectat i documents adjacents amb hisops que es sembren en medis de cultiu específics. Un cop s'ha identificat el microorganisme alterant es procedeix a tractar el document, tot i que molts cops és un procediment costós i la recuperació no és completa.

Una UC capaç de detectar el creixement de *Penicillium rugulosum* en l'ambient, llibres, fotografies i altres suports més recents com CDs o DVDs permetria realitzar:

- Control del patrimoni històric. La funció principal seria el control d'infeccions en els llibres incunables i diferents tipus d'obres d'art, que són els elements amb major valor històric i econòmic.
- Manteniment de fons modern. Realització de revisions periòdiques de manteniment en diferents tipus de fons moderns, com per exemple: biblioteques convencionals, realitzant revisions durant els inventaris anuals; arxius de jutjats, ajuntaments, hospitals i farmàcies degut a la importància legal dels documents i a les males condicions d'emmagatzematge dels arxius antics; biblioteques i fons documental privat (llibres, segells, quadres, etc.); hemeroteques amb fons de documents audiovisuals (cassets, vinils, etc.); museus i galeries d'art (revisió tant de quadres com del material d'exposició i emmagatzematge: vitrines, càmeres, etc.).
- Priorització durant el procés de digitalització. Actualment tots els documents estan en procés de digitalització i, sense cap excepció, els documents amb prioritat han de ser aquells amb una infecció. La detecció del gos pot servir per discriminar quins documents han de ser digitalitzats primer i quins poden esperar, ja que és un procés lent i car.

Els principals avantatges que oferiria la UC de detecció de *Penicillium rugulosum* en l'àmbit de la conservació del patrimoni històric documental són:

- Reducció del temps dedicat a les revisions durant l'inventari. Les revisions actuals mai són completes perquè és virtualment impossible examinar totes les pàgines de tots els llibres d'una biblioteca, per exemple.
- Reducció del pressupost destinat al personal. Un gos detector podria realitzar una revisió molt més ràpida i eficaç, ja que molts tipus d'infeccions no es veuen a simple vista.
- Reducció del cost del tractament. Una detecció precoç suposa un tractament menys agressiu i menys possibilitats d'infecció de documents adjacents.

- Reducció dels riscos laborals. La reducció de la càrrega de microorganismes a l'ambient suposa una menor possibilitat de problemes d'hipersensibilitat i altres alteracions respiratòries, com l'asma, bronquitis crònica o la malaltia pulmonar obstructiva crònica.

Unitat canina per la detecció de *Trichoderma viride*

L'objectiu principal de la UC de detecció de *Trichoderma viride* és realitzar una detecció *in situ* del fong en sòls que han estat biofertilitzats amb les espècies comercials que es poden obtenir en centres especialitzats. La metodologia proposada es basa en la realització de tasts de terra i la recol·lecció d'arrels de plantes silvestres que, posteriorment, poden ser ensumades pel gos *in situ* o ser traslladades fins on es trobi el gos (en cas de mostrejos grans, per exemple).

Una de les principals problemàtiques que existeix actualment amb l'ús de *T. viride* com a biofertilitzant és que la seva capacitat d'implantació als sòls agrícoles és molt variable, per exemple, en funció del tipus de sòl i les espècies de plantes, fongs i bacteris presents. Les principals funcions d'aquesta UC inclourien:

- Determinar de forma ràpida i econòmica l'efectivitat de la implantació de l'inòcul al sòl.
- Realitzar seguiments periòdics de la seva població, per tal de determinar si hi sobreviu.
- Determinar el grau d'homogeneïtat en la colonització de la rizosfera.
- Determinar la supervivència del fong després de realitzar tractaments agrícoles (per exemple, tractaments biocides o ús de fertilitzants químics).

Els principals avantatges que ofereix la UC respecte els mètodes convencionals són, de forma semblant que en el cas de *Penicillium rugulosum*. (1)

reducció del nombre de mostres que es remeten al laboratori, tot i que és imprescindible que un percentatge dels tasts, tot i ser comprovats pel gos, siguin enviats al laboratori per realitzar la confirmació positiva i negativa; (2) obtenció de resultats ràpids i *in situ* i (3) foment de l'ús dels biofertilitzants, contribuint a una producció més sostenible i ecològica.

Altres aplicacions de la detecció de *Trichoderma viride* en el sector agrícola són, per exemple:

- Detecció de *T. viride* en cultius de xampinyons. *T. viride* pot actuar com a paràsit del xampinyó (*Agaricus bisporus*) (Samuels *et al.*, 2002), on és introduït accidentalment amb facilitat a través del compost sobretot des que es fa servir com a agent de biofertilització del sòl. Els xampinyons parasitats presenten una morfologia anòmala i redueixen molt el seu ritme de creixement, pel que no es poden comercialitzar. La UC de detecció de *Trichoderma spp* permetria realitzar un control periòdic del compost que entrés en contacte amb els cultius, així com determinar-ne la presència abans que apareguessin els símptomes de la parasitació.
- Detecció de *T. viride* com a agent de biocontrol. *T. viride* es fa servir com a agent de biocontrol d'altres fongs fitopatògens, pel que una UC permetria determinar, per exemple, l'èxit de la inoculació. Alguns gèneres que és capaç de controlar són: *Rhizoctonia*, fong que destrueix les plàntules de moltes espècies vegetals a nivell mundial (Howell, 2000); *Pythium*, oomicet paràsit inespecífic, causant de podridures de les arrels (Naseby *et al.*, 2000); i *Armillaria*, causant de la podridura blanca de les arrels (Dumas i Boyonoski, 1992).

Finalment, canviant de sector productiu, *Trichoderma viride* també ha estat aïllat com a agent deteriorant del patrimoni històric documental (Bankole, 2010) degut a la seva capacitat per produir cel·lulases. Una UC combinada, capaç de detectar

paral·lelament *Penicillium rugulosum* i *Trichoderma viride*, podria millorar notablement les condicions i avantatges desenvolupats a la discussió de l'apartat "Unitat canina per la detecció de *Penicillium rugulosum*".

Unitat canina per la detecció de *Verticillium dahliae*

Una UC de detecció de *Verticillium dahliae* a les oliveres es proposa com a mètode de detecció precoç del fong. Com que a actualment no existeix un tractament curatiu per aquesta malaltia i es perden completament les plantes infectades, una detecció ràpida i *in situ* ofereix avantatges importants quan a la prevenció del contagi. Així mateix, també permet realitzar un tractament focalitzat de terrenys i plantes (per exemple, combinant-ho amb el tractament químic i la solarització) i, si es combina amb els mètodes preventius més recents, la detecció de les oliveres infectades a temps real permet reduir els costos derivats de la vacunació o injecció de retardants de la infecció contribuint, de forma global, a la reducció de les pèrdues econòmiques derivades de la verticilosi.

La importància de la detecció precoç de la malaltia radica en que, un cop apareixen els símptomes, la planta ja està greument infectada i no existeix un tractament curatiu. La presentació d'aquests símptomes depèn de la varietat de *Verticillium dahliae* que infecti l'olivera i, tot i que aquestes varietats poden conviure en un mateix sòl, es pot diferenciar una varietat defoliant i una no defoliant. La varietat defoliant és més virulenta, té major taxa de mortalitat i la infecció es pot percebre a simple vista (Ministeri d'Agricultura i Pesca, 2010); d'altra banda, la varietat no defoliant, que redueix la productivitat d'olives, és difícil de percebre i és en aquests casos en que una UC actuaria com a sistema d'alarma.

L'ús de la UC no va en contra dels mètodes de detecció actuals, ja que en cas de trobar indicis d'infecció sempre es recomana procedir amb el protocol microbiològic habitual al laboratori. En aquests casos, s'han de remetre al laboratori

mostres de teixit que seran processades per realitzar un cultiu microbiològic tradicional mitjançant sembra en medi PDA o un anàlisi mitjançant PCR.

La determinació mitjançant tècniques microbiològiques tradicionals triga un mínim 5 dies, es treballa amb un volum de mostres reduït i presenta una elevada sensibilitat i especificitat. D'altra banda, les tècniques basades en la biologia molecular com la PCR són més ràpides i permeten treballar amb un volum de mostres major, tot i que poden ser menys específiques (Morera *et al*, 2005).

En tot cas, la combinació del mètodes de diagnòstic laboratorial amb un *screening* previ mitjançant UC permetria reduir el volum de mostres i els costos de processament considerablement.

Igual que en els dos casos anteriors, en aquest estudi s'ha determinat la capacitat d'una UC per detectar el fong en un entorn de treball controlat. Referent a la detecció en entorn reals, existeix la possibilitat d'aplicar la UC en una gran varietat de substrats que inclouen, principalment: tasts de terra, brots d'olivera, males herbes, aigües de regadiu, maquinària agrícola i altres plantes susceptibles a la infecció (per exemple, plantes ornamentals com *Petunia* spp., plantes aromàtiques com *Mentha* spp. o hortofrutícoles com *Persea americana*).

Els resultats favorables dels estudis indiquen que l'ús d'UC de biodetecció aplicades als cultius d'oliveres podria estendre's a la detecció d'altres malalties infeccioses, com l'ull de gall de l'olivera causat per *Cylindroclonus oleaginum*, la negreta o rovell produït per *Capnodium* spp. i *Alternaria* spp. o la tuberculosi de l'olivera deguda a la infecció per *Pseudomonas syringae*. La detecció ràpida i precoç d'aquestes malalties suposa una reducció de les pèrdues econòmiques derivades del tractament i de la disminució de la qualitat del producte final.

De la mateixa manera que es poden detectar malalties causades per microorganismes, altres autors han demostrat que és possible detectar insectes causants de plagues i infestacions, com els dípters del gènere *Calliphoridae* (Welch, 1990). Algunes de les plagues més destacades de l'olivera i que es podrien controlar

mitjançant les UC són les que causen la caiguda del fruit, com la mosca de l'olivera (*Dacus oleae*) i l'arna de l'olivera (*Prays oleae*), i les plagues que succionen limfa i assequen la planta, com la cotxinilla negra (*Salssetia oleae*) i el cotonet de l'olivera (*Euphyllura oleae*).

Un altre punt a considerar és que els símptomes de la verticilosi són més greus quan aquesta interacciona amb altres patògens, com per exemple: fongs (*Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Colletotrichum*), bacteris (*Erwinia*) i nematodes (*Pratylenchus*, *Meloidogyne*, *Globodera*). Pel que fa als nematodes, si aquests infecten les arrels de l'olivera poden augmentar la incidència de verticilosi i tenir un efecte sinèrgic sobre la gravetat dels símptomes (Pegg i Brady, 2002), ja que provoquen ferides que faciliten l'entrada del fong. A més, aquestes ferides solen estimular exsudats radiculars que provoquen la germinació dels microesclerocis de *Verticillium dahliae*. Els nematodes són un problema creixent en els vivers d'oliveres i, a mig termini, pot convertir-se en un problema fitosanitari important. Com ja s'ha comentat a l'inici de la tesi, tant els bacteris com els nematodes poden ser detectats mitjançant UC, el que obre les portes a una UC de protecció global front les malalties de l'olivera.

Les mesures preventives són les més efectives per lluitar contra la malaltia, destacant l'ús de plantes lliures del patogen, l'establiment de plantacions en terres no infestats i la vacunació. També s'han de prendre mesures per evitar l'arribada del patogen, que podria produir-se pel moviment de partícules del sòl degut a riades, vent i moviments del terra (Jiménez Díaz, 2012). En cas de recórrer a tractaments químics, només s'han de fer servir els principis actius autoritzats. Independentment del tipus de mesures de prevenció utilitzades, es poden combinar amb un *screening* ràpid del terra mitjançant UC per determinar la seva eficàcia i augmentar les mesures de seguretat.

Respecte les plantacions infectades pel fong, les mesures clàssiques que permeten evitar la seva expansió inclouen: eliminació i crema dels teixits infectats, evitar sembrar cultius susceptibles de forma intercalada, eliminar les males herbes, realitzar una fertilització equilibrada (evitar l'excés de nitrogen i la falta de potassi), realitzar un maneig adient del regadiu, fer servir varietats tolerants o resistents, emprar fertilitzants orgànics i solaritzar el terreny afectat. L'ús d'UC en aquests casos

permetria, per exemple, detectar les plantes i els teixits afectats, tant oliveres com males herbes, determinar la qualitat del terra mitjançant tasts *in situ* i determinar la presència de *Verticillium dahliae* a l'aigua de regadiu.

Detecció d'altres microorganismes

Actualment existeixen poques empreses que treballen en la detecció de fongs i bacteris amb unitats canines. Aquest tipus d'empreses estan molt més desenvolupades als Estats Units que a Europa i els fongs amb els que treballen són, principalment:

- *Leptographium spp.* Dins aquest gènere existeixen quatre espècies que ataquen les arrels dels arbres, en especial de certes espècies de pi, fins a l'extrem de suposar una plaga. A Estats Units s'han entrenat gossos capaços de detectar aquests fongs subterranis des de la superfície (Eckhardt i Steury, 2011).
- *Serpula lacrymans.* És un tipus de fong capaç de degradar la cel·lulosa i la lignina de la fusta i que es desenvolupa principalment en espais interiors, el que suposa un problema especialment greu en el nord d'Europa i Estats Units on la construcció es basa en l'ús d'aquest material. Actualment s'estan fent servir gossos de treball com a mètode de detecció precoç, ja que un diagnòstic a temps permet tractar la fusta i conservar-la durant més temps (Palfreyman, 2002).
- Floridures de les cases. Dins aquest grup s'engloben molts fongs de gèneres diferents, la majoria amb potencial toxigènic: *Stachybotrys*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Ulocladium*, *Stemphylium*, *Alternaria*, *Dreschlera* i *Aureobasidium*. Són fongs que poden créixer a l'interior de les cases i que, a més de deteriorar-ne l'estructura, poden arribar a causar problemes de salut en les persones que hi habiten com poden ser al·lèrgies, problemes respiratoris i altres patologies sistèmiques (Kauhanen *et al.*, 2002).

L'especialitat de la biodetecció dins l'àmbit de les UC ofereix la possibilitat d'ensinistrar gossos per detectar un gran ventall de fongs. La possibilitat d'ensinistrar gossos perquè detectin específicament aquests microorganismes suposa, en la majoria de casos, una millora quan al temps invertit en la presa de mostres, processament, aïllament i identificació. A la Taula 26 s'esmenten alguns exemples de fongs susceptibles a ser detectats i, a la Taula 27, alguns bacteris.

Taula 26. Gèneres de fongs susceptibles a ser detectats amb UC de biodetecció, principal problemàtica que suposa el seu desenvolupament i sector al que pertany la problemàtica.

GÈNERE DE FONG	PROBLEMÀTICA	SECTOR
<i>Microsporium</i> <i>Trichophyton</i> <i>Epidermophyton</i>	Dermatòfit	Sanitat
<i>Aspergillus</i> <i>Fusarium</i> <i>Penicillium</i>	Producció de micotoxines en aliments	Seguretat alimentària
<i>Penicillium</i> <i>Cladosporium</i> <i>Alternaria</i>	Alteradors de substrat cel·lulòsics	Patrimoni històric
<i>Stachybotrys</i> <i>Aspergillus</i> <i>Cladosporium</i> <i>Ulocladium</i> <i>Stemphylium</i> <i>Pithomyces</i> <i>Alternaria</i> <i>Dreschlera</i> <i>Aureobasidium</i>	Floridures de les cases	Sanitari

Taula 27. Bacteris susceptibles a ser detectats amb UC de biodetecció, principal problemàtica que suposa el seu creixement i sector al que pertany la problemàtica.

BACTERI	PROBLEMÀTICA	SECTOR
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Clostridium difficile</i>	Bacteris causants d'infeccions nosocomials	Sanitat
<i>Legionella spp</i>	Bacteris causants d'infeccions de les vies respiratòries	Salud Pública Àmbit hospitalari Indústria de la construcció
<i>Clostridium spp</i>	Bacteris contaminants d'aigües residuals	Depuradores i plantes de tractament d'aigües

PROCEDIMENTS DE PRECAUCIÓ I SEGURETAT

El mètode d'obtenció de mostres ha permès realitzar un recompte general dels bacteris i fongs presents a la mucosa nasal del gos. Tot i que s'ha demostrat que el mostreig amb hisop trans-nasal no permet reflectir de forma acurada la microbiologia de la totalitat de la cavitat nasal (Abramson *et al.*, 1976), sí que permet detectar diferències significatives entre individus si es realitzen sembres posteriors en diferents medis de cultiu. A més, degut al treball que realitzen els individus mostrejats, altres tècniques més invasives com l'aspirat naso-faríngic, el rentat nasal o les biòpsies (independentment del tipus, existint la biòpsia traumàtica central, la cega i l'assistida amb rinoscòpia) no són en absolut aconsellables.

Quan als resultats obtinguts, tot i que existeixen diferències en els recomptes realitzats per les mostres dels diferents individus, aquestes no es deuen a l'ensinistrament realitzat amb les mostres produïdes al laboratori. Un dels principals

riscos a considerar durant l'ensinistrament era que el fong amb el qual es treballava colonitzés la cavitat nasal del gos si les mostres no estaven elaborades correctament. El recompte de fongs, que en tots els casos ha estat inferior a 10 colònies per mostra, indica que no s'ha produït colonització de la mucosa i, a més, els dos fongs identificats són d'origen ambiental: *Cladosporium herbarum* s'ha aïllat en tres individus (el control i els gossos ensinistrats per detectar *Penicillium rugulosum* i *Trichoderma viride*) i *Fusarium moniliforme* al gos ensinistrat per detectar *Penicillium rugulosum*. *Cladosporium herbarum* és un fong ubiqüitari i que s'aïlla freqüentment a l'aire, tant en zones rurals com urbanes, el sòl i a la superfície d'aliments d'origen vegetal (Zalar *et al.*, 2007). El gènere *Fusarium* està àmpliament distribuït al sòl i la majoria d'espècies són sapròfites, tot i que poden actuar com a patògens facultatius en animals i persones immunodeprimits (Anaissie *et al.*, 1988). La majoria d'espècies de *Fusarium*, entre elles *Fusarium moniliforme*, són productores de micotoxines (fumonisines, zearalenona i tricotecens) quan es desenvolupen als aliments (Norred, 1993). Els resultats del recompte i aïllament de fongs, juntament amb el correcte estat de salut dels individus, indiquen que les mostres són totalment innòcues i aptes per ensinistrar gossos en aquesta especialitat.

En els 4 individus es produeix un elevat recompte de bacteris quan les mostres són sembrades en medi enriquit (Agar Sang) i inferior en medi general (Agar TSA), tal i com s'espera degut a les característiques dels medis. En tots els individus el recompte d'enterobacteris és molt baix. La microbiota dels individus A i B (gos control i gos ensinistrat per detectar *Penicillium rugulosum*) presenta certes diferències respecte la dels individus C i D (gos ensinistrat per detectar *Trichoderma viride* i *Verticillium dahliae*, respectivament). El primer grup (gossos A i B) presenten un recompte de bacteris totals superior en condicions d'anaerobiosi que en aerobiosi, així com un major creixement de lactobacils (medi MRS) i d'estafilococs. Una possible explicació, a part de la possibilitat de que les condicions microbiològiques a nivell ambiental fossin clarament diferents en el cas dels gossos A i B, és que aquests presenten una morfologia cranial dolicocefala, mentre que els individus C i D són mesocèfals. Tot i que no existeixen estudis al respecte, és possible que l'increment de turbulències que experimenta l'aire durant el seu pas pels cornets nassals d'un individu dolicocefal

respecte un mesocèfal produeixi una menor uniformitat en la ventilació de la mucosa, pel que en la microbiota dels individus dollicocèfals podria desenvolupar-se una major diversitat de bacteris anaerobis aerotolerants (com els lactobacils) o anaerobis facultatius (com per exemple, estafilococs).

A l'hora de treballar amb Unitats Canines no només s'ha de considerar la seguretat del gos, sinó també la de l'ensinistrador, instructor i els seus cuidadors. Una zoonosi és una malaltia que pot ser transmesa dels animals a les persones. L'estudi de les zoonosis integra la medicina humana, la veterinària i les ciències ambientals. En el cas dels instructors, ensinistradors, guies canins i veterinaris les zoonosis contagiades per l'espècie canina poden ser considerades com a possibles malalties professionals. L'Organització Mundial de la Salut (OMS) reconeix 174 malalties zoonòtiques importants, de les quals el gos és capaç de transmetre'n 53.

Els agents infecciosos i parasitaris involucrats són:

- Virus. Destaquen la Malaltia del Dengue (Flavivirus), el Síndrome Pulmonar (Hantavirus), la variant de la Verola (Orthopoxvirus) i la Ràbia (Rhabdovirus), essent aquesta última la única malaltia zoonòtica vírica per la qual s'han establert estratègies vacunals profilàctiques, tot i que actualment no és obligat vacunar contra la Ràbia a Catalunya.
- Bacteris. S'hi troben bacteris sanguinis com *Borrelia burgdorferi* i *Ehrlichia canis* (causants de la Malaltia de Lyme i l'ehrlichiosis, respectivament), habitualment transmesos per paparres, i bacteris de transmissió alimentària com *Leptospira* spp, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter foetus*, *Salmonella enteritidis* i *Pasteurella multocida*. La leptospirosi és la única malaltia zoonòtica causada per bacteris que s'inclou als plans vacunals dels gossos, tot i que en cap cas és obligatòria.
- Fongs. Poden ser causants de micosis sistèmiques, com *Cryptococcus neoformans* i *Histoplasma capsulatum*, o cutànies, com *Microsporium canis* i *Trichophyton mentagrophytes*.
- Endoparàsits. Destaquen els protozous lliures intestinals (*Cryptosporidium* spp, *Giardia lablia*, *Isospora belli*) i intracel·lulars (*Toxoplasma gondii*), cestodes

(*Toxocara canis*, *Taenia spp*, *Dipylidium caninum*) i nematodes (*Trichinella spiralis*, *Ancylostoma caninum*).

- Ectoparàsits. Causants de sarnes (*Sarcoptes scabiei*, *Demodex canis*, *Cheyletiella yasguri*), infestacions per paparres (*Ixodes spp*, *Dermacentor reticulatus*, *Rhytcephalus sanguineus*), pulicosi (*Ctenocephalides canis*) i miasis (*Cochliomyia hominivorax*, *Dermatobia hominis*).

L'establiment de protocols profilàctics vacunals i antiparasitaris, així com un bon maneig i manteniment de la higiene del gos i de les seves instal·lacions (elements que no es desenvoluparan en aquesta discussió) permeten, en la gran majoria del casos, evitar o minimitzar el risc de patir zoonosis derivades del contacte amb el gos.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. Els gossos, correctament ensinistrats, poden detectar i localitzar fongs miceliats a diferents entorns, oferint una forma de treball econòmica, fiable, de fàcil implantació i amb un ampli rang de possibilitats d'aplicació, particularment en el sector agrari.
2. El perfil de compostos orgànics volàtils emesos per una espècie de fong es pot extreure mitjançant les tècniques desenvolupades en aquesta Tesi i les mostres resultants s'adapten a la forma de treballar actual amb els gossos de detecció. Aquestes mostres en cap cas esdevenen perilloses pel gos, l'ensinistrador o el medi ambient.
3. Les Unitats Canines de detecció de fongs aplicades al sector agrari són útils per la detecció precoç de malalties infeccioses tant en pre-collita com en post-collita i en la determinació de l'efectivitat d'inoculació de biofertilizants. Presenten avantatges importants quan al temps invertit en el processament de mostres i de diagnòstic alhora que permeten realitzar tractaments focalitzats i de menor inversió econòmica, podent-se combinar fàcilment amb la resta de mètodes actuals, tant preventius com curatius o pal·liatius.

BIBLIOGRAFIA

- [1]. Abramson, AL., D'Amato, RF., Isenberg, HD. (1976). Microbiology of the canine nasal cavities. *Annals of Otology, Rhinology and Laryngology*. 85 (3): 394 – 398.
- [2]. Akenson, JJ., Henjum, MG., Wertz, TL., Craddock, TJ. (2001). Use of dogs and mark-recapture techniques to estimate American Black Bear density in northeastern Oregon. *Ursus*. 12: 203 – 210.
- [3]. Al-Ahmed, MA., Mosli MN. (1993). *Verticillium* wilt of olive in Syria. *Bull OEPP/EPPO*. Bull 23: 521 – 529.
- [4]. Amiri, A., i Bompeix, G. (2005). Diversity and population dynamics of *Penicillium* spp. on apples in pre-and postharvest environments: consequences for decay development. *Plant Pathology*. 54(1), 74-81.
- [5]. Anaissie, EH., Kantarjian, J., Hopfer, R., Rolston, K., Fainstein, V., Bodey, G. (1988). The emerging role of *Fusarium* infections in patients with cancer. *Medicine*. 67: 77 – 83.
- [6]. Bankole, OM. (2010). A review of biological deterioration of library materials and possible control strategies in the tropics. *Library Review*. 59 (6): 414 – 429.
- [7]. Bejarano Alcázar, J. (2003). La verticilosis del olivo: bases ecológicas y epidemiológicas para el desarrollo de estrategias de control sostenible en viveros y plantaciones del olivar. 8º *Symposium Nacional de Sanidad Vegetal*. Sevilla, España.
- [8]. Bejarano Alcázar, J. i Ibrahen Mohamed, M. (2004). Influencia de la flora arvensis del olivar sobre las epidemias de verticilosis inducidas por los patotipos defoliante y no defoliante de *Verticillium dahliae*. *XI Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología*. Almería, España.
- [9]. Belardi, R. i Pawliszyn, J. (1989). The application of chemically modified fused silica fibers in the extraction of organics from water matrix samples and their

- rapid transfer to capillary columns. *Water Pollution Research Journal of Canada*. 24(1): 179 – 191.
- [10]. Bellahcene M., Fortas, Z., Geifer, JP., Matallah, A., Henni, D. (2000). *Verticillium* wilt on olive in Algeria: geographical distribution and extent of the disease. *Olivae* 82: 41 – 43.
- [11]. Benítez, T., Rincón, AM., Limón, MC., Codón, AC. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology* 7: 249-260.
- [12]. Betancourt, DA., Krebs, K., Moore, SA., Martin, SM. (2013). Microbial volatile organic compound emissions from *Stachybotrys chartarum* growing on gypsum wall-board and ceiling tile. *BMC Microbiology*. 13: 283.
- [13]. Bingley, GD., Verran, J., Munro, LJ., Craig, E., Banks, CE. (2012). Identification of microbial volatile organic compounds (MVOCs) emitted from fungal isolates found on cinematographic film. *Analytical Methods*. 4: 1265–1271
- [14]. Blanco López, MA. i Jiménez Díaz, RM. (1995). Una propuesta de lucha integrada contra la verticilosis del olivo. *Fruticultura profesional*. 70: 52 – 58.
- [15]. Brooks, SE., Oi, FM., Koehler, PG. (2003). Ability of canine termite detectors to locate live termites and discriminate them from non-termite material. *Journal of Economic Entomology*, 96: 1259 – 1266.
- [16]. Browne, CM. (2005). The use of dogs to detect New Zealand Reptile scents. Unpublished Master of Science thesis. Massey University, New Zealand.
- [17]. Browne, CM., Stafford, K., Fordham, R. (2006). The use of scent-detection dogs. *Irish Veterinary Journal*. 52: 97 - 104.
- [18]. Bulanda, S. (2002). Training method and apparatus for training and using dogs in the detection of contaminants. US Patent 6,425,350 B2.
- [19]. Busko, M., Kulik, T., Ostrowska, A., Góral, T., Perkowski, J. (2014). Quantitative volatile compound profiles in fungal cultures of three different *Fusarium graminearum* chemotypes. *FEMS Microbiology Letters*. 359 (1): 85 – 93.

- [20]. Caballero, JM., Pérez Henrández, J., Blanco López, MA., Jiménez Díaz, RM. (1980). Olive, a new host of *Verticillium dahliae* in Spain. *Proceedings of the 5th Congress of Mediterranean Phytopathology*. Patras, Grècia.
- [21]. Caldwell, PT., Tipple, C., Dulgerian, N., Eckenrode, BD., Stockham, R. (2009). Characterization of Pseudo Corpse Scents used as canine training aids. Conference paper. *61st American Chemical Society Southeast Regional Meeting*. San Juan, Puerto Rico.
- [22]. Calvo, MA., Adelantado, C., Agut, M. (2006). Identificació de microorganismes que afecten el patrimoni documental. Dins Varis Autors (Generalitat de Catalunya, Departament de Cultura). *La problemàtica dels fongs en el patrimoni històric documental*. (p. 27 – 37). Arxivística i Gestió Documental. Conservació i Restauració. Barcelona.
- [23]. Comerio, RM. (2000). Nefrotoxinas y especies nefrotóxicas del género *Penicillium*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 17: 82- 89.
- [24]. Correa, JE. (2011). The Dog's Sence of Smell. *Alabama Cooperative Extension System, Extension Animal Scientist*. UNP-0066.
- [25]. Crook, A. (2000). Use of odour detection dogs in residue management programs. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 13: 219 – 219.
- [26]. Culliney, TW. i Grace, JK. (2000). Prospects for the biological control of subterranean termites (Isoptera: *Rhinotermitidae*), with special reference to *Coptotermes formosanus*. *Bulletin of Entomological Research*, 90: 9 – 21.
- [27]. Demyttenaere, JCR., Moríña, RM., Sandra, P. (2003). Monitoring and fast detection of mycotoxin-producing fungi based on headspace solid-phase microextraction and headspace sorptive extraction of the volatile metabolites. *Journal of Chromatography A*. 985: 127 – 135.
- [28]. Dumas, MT. i Boyonoski, NW. (1992). Scanning electron microscopy of mycoparasitism of *Armillaria* rhyzomorphs by species of *Trichoderma*. *European Journal of Forest Pathology*. 22 (6-7): 379 – 383.
- [29]. Eckhardt, L. i Steury, TD. (2011). Root diseases and timber dogs. *Silviculture Magazine*. Fall, 30 – 1.

- [30]. Eisert, R. i Levsen, K. (1996). Solid-phase microextraction coupled to gas chromatography: a new method for the analysis of organics in water. *Journal of Chromatography A*. 733 (1): 143 – 175.
- [31]. Engeman, RM., Rodríguez, DV., Linnel, MA., Pitzler, ME. (1998). A review of the case histories of the brown tree snakes (*Boiga irregularis*) located by detector dogs on Guam. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 42: 161 – 165.
- [32]. Engeman, RM., Vice, DS., Rodríguez, DV., Gruver, KS., Santos, WS., Pitzler, ME. (1998). Effectiveness of the detector dogs used for deterring the dispersal of brown tree snakes. *Pacific Conservation Biology*, 4: 256 – 260.
- [33]. Engeman, RM., Vice, DS., York, D., Gruver, KS. (2002). Sustained elevation of the effectiveness of detector dogs for location brown tree snakes in cargo outbound from Guam. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 49: 101 – 106.
- [34]. Fiedler, K., Schütz, E., Geh., S. (2001). Detection of microbial volatile organic compounds (MOVCS) produced by molds on various materials. *International Journal Hygiene Environmental Health*. 204: 111 – 121.
- [35]. Filipiak, W., Sponring A., Bauer., Filipiak A., Ager C., Wiesenhofer H., Nagi M., Troppmair, J., Amann A. (2012). Molecular analysis of volatile metabolites released specifically by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiology*. 12 (1): 113.
- [36]. Furton, KG. i Myers, IJ. (2001). The scientific foundation and efficacy of the use of canines as chemical detectors for explosives. *Talanta* 54: 487 – 500.
- [37]. Gibson, TD., Prosser, O., Hulbert, JN., Marshall, RW., Corcoran, P., Lowery, P., Rick-Keene, EA., Heron, S. (1997). Detection and simultaneous identification of microorganisms from headspace samples using an electronic nose. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 44 (1): 413 – 422.

- [38]. Hart, BL. (1987). Roles of the Olfactory and Vomeronasal Systems in Behavior. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 3: 463-473.
- [39]. Hawk, HW., Conley, HH., Kiddy, CA. (1984). Estrus-related odours in milk detected by trained dogs. *Journal of Dairy Science*, 67: 392 – 397.
- [40]. Hebart, C. (1993). Use of search and rescue dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 203: 999 – 1001.
- [41]. Hiemstra, JA. (1998). Some general features of *Verticillium* wilts in trees. *A Compendium of Verticillium Wilts in Tree Species*. 5 – 11.
- [42]. Howell, CR. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant disease*. 87 (1): 4 – 10.
- [43]. Hübert, T., Tiebe, C., Stephan, I. (2011). Detection of fungal infestations of wood by ion mobility spectrometry. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 65: 675–681.
- [44]. Jiménez Díaz, RM. (2003). Retos de la fitopatología para la práctica de la sanidad vegetal en la agricultura sostenible del siglo XXI. *8º Simposium Nacional de Sanidad Vegetal*. Sevilla, España.
- [45]. Jiménez Díaz, RM. (2012). Manejo Integrado de la Verticilosis del Olivo: uso de patrones resistentes al patotipo defoliante de *Verticillium dahliae* y de tratamientos con agentes de biocontrol. *IX Foro INLA Olivar y Aceite de Oliva*. Córdoba, España.
- [46]. Joblin, Y., Moularat, S., Anton, R., Bousta, F., Orial, G., Robine, E., Picon, O., Bourouina, T. (2010). Detection of molds by volatile organic compounds: application to heritage conservation. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 64: 210–217
- [47]. Kauhanen, E., Harri, M., Nevalainen, A., Nevalainen, T. (2002). Validity of detection of microbial growth in buildings by trained dogs. *Environment International*. 28: 153 – 157.
- [48]. Kiddy, CA., Mitchell, DS., Bolt, DJ., Hawk, HW. (1978). Detection of estrus-related odours in cows by trained dogs. *Biology of Reproduction*. 19: 389 – 395.

- [49]. Kiddy, CA., Mitchell, DS., Hawk, HW. (1984). Estrus-related odors in body fluids of dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 67: 388 – 391.
- [50]. Klimek-Ochab, M., Brzezińska-Rodak, M., Żymańczyk-Duda, E., Lejczak, B., & Kafarski, P. (2011). Comparative study of fungal cell disruption-scope and limitations of the methods. *Folia Microbiologica*. 56 (5): 469 – 475.
- [51]. Korpi, A., Pasanen, AL., Pasanen, P. (1998). Volatile compounds originating from mixed microbial cultures on building materials under various humidity conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. 64 (8): 2914 – 2919.
- [52]. Kurz, ME., Billard, M., Retting, M., Augustiniak, J. (1994). Evaluation of canines for accelerant detection at fire scenes. *Journal of Forensic Sciences*. 39: 1528 – 1536.
- [53]. Kuske, M., Romain, AC., Nicolas, J. (2005). Microbial volatile organic compounds as indicators of fungi. Can an electronic nose detect fungi in indoor environments? *Building and Environment*. 40: 824 - 831.
- [54]. Lasseter, AE., Jacobi, KP., Farley, R., Hensel, L. (2003). Cadaver dog and handler team capabilities in the recovery of buried humans remains in the southeastern United States. *Journal of Forensic Science*. 48: 617 – 621.
- [55]. Lavine, BK., Mirjankar, N., LeBouf, R., Rossner, A. (2012). Prediction of mold contamination from microbial volatile organic compound profiles using solid phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Microchemistry Journal*. 103: 37 – 41.
- [56]. Lemfack, MC., Nickel J., Dunkel M., Preissner R., Piechulla B. (2013). mVOC: a database of microbial volatiles. *Nucleic Acids Research*. 42 (D1): 744 – 748.
- [57]. Lewis, VR., Fouche, CF., Lemaster, RL. (1997). Evaluation of dog-assisted searches and electronic odor devices for detecting the western subterranean termite. *Forest Products Journal*. 47: 79 – 84.
- [58]. Lindsay, S. (2000). Handbook of applied dog behaviour and training. Adaptation and Learning. John Wiley & Sons.

- [59]. Lorenz, W. i Diederich, T. (2001). How to Find Hidden Microbial Growth with a mold Dog. Dins *Proceedings of IAQ 2001 ASHRAE Conference*. San Francisco, California.
- [60]. Lorenzo, N., Wan, TL., Harper, RJ., Hsu, YL., Chow, M., Rose, S., Furton, KG. (2003). Laboratory and field experiments used to identify *Canis lupus var familiaris* active odour signature chemicals from drugs, explosives and humans. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 376: 1212 – 1224.
- [61]. Luo, H., Schmid, F., Grbi, PR., Jiranek, V. (2012). Viability of common wine spoilage organisms after exposure to high power ultrasonic. *Ultrasonics Sonochemistry*. 19 (3): 415 – 420.
- [62]. Manteca, X. (1996). Etología Clínica Veterinaria del Perro y del Gato. *Mecanismos de control de la conducta*. Edit. Multimédica. España.
- [63]. Ministerio de Agricultura y Pesca. (2010). *Verticillium dahliae*. Servicio nacional de sanidad y calidad agroalimentaria
- [64]. Morera, B., Páez, JI., Vega, JM., Montes, F. (2005). Comparación de métodos de diagnóstico de *Verticillium dahliae* en olivo: aislamiento en medio de cultivo y PCR. *Plagas*. 31: 267-275.
- [65]. Morris, CE., Monier, JM., Jacques, MA. (1998). A technique to quantify the population size and composition of the biofilm component in communities of bacteria in the phyllosphere. *Applied and environmental microbiology*, 64 (12): 4789 - 4795.
- [66]. Mule, R., Fodale, AS., Tucci, A. (2000). Control of olive *Verticillium* wilt by trunk injection with different doses of fosetyl-AI and benomyl. *Proceedings of the IV International Symposium on Olive Growing*. 761 – 764. Portugal.
- [67]. Nakash, J., Osem, Y., Kehat, M. (2000). A suggestion to use dogs for detecting red palm weevil (*Rhynchophorus ferrugineus*) infestation in date palms in Israel. *Phytoparasitica*. 28: 153 – 155.
- [68]. Naseby DC., Pascual, JA., Lynch, JM. (2000). Effect of biocontrol strains of *Trichoderma* on plant growth, *Pythium ultimum* populations, soil microbial

- communities and soil enzyme activities. *Journal of Applied Microbiology*. 88 (1): 161 – 169.
- [69]. Navarro, C., Fernández-Escobar, R., Benlloch, M. (1992). A low-pressure trunk injection method for introducing chemical formulations into olive trees. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 117: 357 – 360.
- [70]. Nielsen, KF. (2003). Mycotoxin production by indoor molds. *Fungal Genetics and Biology*. 39: 103–117.
- [71]. Norred, WP. (1993). Fumonisin-mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 38 (3): 309 – 328.
- [72]. O'Hare, J. (2011). Neuropsicología canina. *Introducción al Sistema nervioso, el estrés, la emoción y la reducción del estrés*. KNS Ediciones.
- [73]. Palfreyman, JW. (2002). The Domestic Dry Rot Fungus, *Serpula lacrymans*, its natural origins and biological control. Dins *Ariadne Workshop*.
- [74]. Pegg, GF. i Brady, BL. (2002). *Verticillium* wilts. CABI.
- [75]. Pickel, D., Manucy, GP., Walker, DB., Hall, SB., Walker, JC. (2004). Evidence for canine olfactory detection of melanoma. *Applied Animal Behaviour Science*. 89: 107 – 116.
- [76]. Reindl, S., Higgins, K., Whitelaw, A., Hurt, A., Shivik, J. (2004). Efficacy of scent dogs in detecting black-footed ferrets (*Mustela nigripes*) at a reintroduction site in South Dakota. Tesis Doctoral. *South Dakota State University*. Brookings.
- [77]. Rifai MA. (1969). A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological Research*. 116: 1 – 56.
- [78]. Ruggieri, G. (1946). Una nuova malattia dell'olivo. *L'Italia Agricola*. 83: 369 – 372.
- [79]. Ruiz, M. (2012). Unidad Canina de Biodetección. Aplicación en Seguridad Alimentaria. Detección de hongos productores de micotoxinas. Escola de Previsió i Seguretat Integral. Universitat Autònoma de Barcelona.
- [80]. Ruíz Baena, N., Serrano Castillo, N., López-Escudero, FJ. (2008). La verticilosis en el olivar: estrategias y métodos de lucha. Instituto de

- Investigación y Formación Agraria. Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía. España.
- [81]. Samuels, GJ., Dodd, SL., Gams, W., Castelbury, LA., Petrini, O. (2002). *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. *Mycologia*. 94 (1): 146 – 170.
- [82]. Sánchez Hernández, ME., Pérez de Algaba, A., Blanco López, MA., Trapero Casas, A. (1998). La seca de olivos jóvenes I: Sintomatología e incidencia de los agentes asociados. *Boletín de Sanidad Vegetal*. 24: 551 – 572.
- [83]. Sant’Ana AS., Rosenthal, A., Massaguer, PR. (2009). Heat resistance and the effects of continuous pasteurization on the inactivation of *Byssochlamys fulva* ascospores in clarified apple juice. *Journal of applied Microbiology*. 107 (1): 197 – 209.
- [84]. Sawoszczuk, T., Sygula-Cholewinska, J., Del Hoyo-Meléndez, J. (2015). Optimization of headspace solid phase microextraction for the analysis of microbial volatile organic compounds emitted by fungi: Application to historical objects. *Journal of Chromatography A*. 149: 30 – 45.
- [85]. Schoon, GAA. i De Bruin, JC. (1994). The ability of dogs to recognize and cross-match human odours. *Forensic Science International*. 69: 111 – 118.
- [86]. Schoon, GAA. (1996). Scent identification line ups by dogs: experimental design and forensic application. *Applied Animal Behavior Science*. 49: 257 – 267.
- [87]. Serrhini MN. i Zeroulen, A. (1997). La verticilosis del olivo en Marruecos. *Olivae*. 58: 58 – 61.
- [88]. Smith, DA. i Ralls, K. (2001). Canine assistants for conservationists. *Science*. 291: 435.
- [89]. Smith, DA., Ralls, K., Hurt, A., Adams, B., Parker, M., Davenport, B., Smith MC., Maldonado, JE. (2003). Detection and accuracy rates of dogs trained to find scats of San Joaquin kit foxes (*Vulpes macrotis mutica*). *Animal Conservation*. 6: 339 - 346.
- [90]. Stadler, S., Stefanuto, PH., Byer, JD., Forbes, S., Focant, JF. (2012). Analysis of synthetic canine training aids by comprehensive two-dimensional gas

- chromatography – time of flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1255: 202 – 206.
- [91]. Subbarao, K. (2002). Methyl bromide alternatives. Meeting the Deadlines. *Phytopathology*. 92 (12): 1334 – 1336.
- [92]. Swietliczkowa, I., Szusterowska-Martinowa, E., Braciak, W. (1984). Clinical evaluation of 1% clotrimazole ointment in the treatment of corneal mycoses. *Klinika oczna*. 86: 221 - 223.
- [93]. Tacher, S., Ouignon, P., Rumbault, M., Dreano, S., Andre, C., Galibert, F. (2005). Olfactory receptor sequence polymorphism within and between breeds of dogs. *Journal of Heredity*. 96 (7): 812 – 816.
- [94]. Thanassoulopoulos, CC., Biris, DA., Tjamos, EC. (1979). Survey of *Verticillium* wilt of olive trees in Greece. *Plant disease reporter* 63: 936 – 940.
- [95]. Thom, C. (1919). Cultural studies of species of *Penicillium*. *Bureau of Animal Industry Bulletin*. 118: 1 – 107.
- [96]. Wady, L., Bunte, A., Pehrson, C., Larsson, L. (2003). Use of gas chromatography-mass spectrometry/solid phase microextraction for the identification of MVOCs from mouldy building materials. *Journal of Microbiology Methods*. 52 (3): 332 – 385.
- [97]. Wallner, WE. i Ellis, TL. (1976). Olfactory detection of gypsy moth pheromone and egg masses by domestic canines. *Environmental Entomology*. 5: 183-186.
- [98]. Wasser, SK., Davenport, B., Ramage, ER., Hunt, KE., Parker, M., Clarke, C., Stenhouse, G. (2004). Scat detection dogs in wildfire research and management: application to grizzly and black bears in the Yellowhead Ecosystem. *Canadian Journal of Zoology*. 82: 475 – 492.
- [99]. Welch, JB. (1990). A detector dog for screwworms (Diptera: *Calliphoridae*). *Journal of Economic Entomology*. 83: 1932 – 1934.
- [100]. Wilhborg, R., Pippitt, D., Marsili, R. (2008). Headspace sorptive extraction and GC-TOFMS for the identification of volatile fungal metabolites. *Microbiological Methods*. 75: 244–250

- [101]. Wilkins, K., Larsen., Simkus, M. (2000). Volatile metabolites from mold growth on Building materials and synthetic media. *Chemosphere*. 41 (3), 437 – 446.
- [102]. Willis, CM., Church, SM., Guest, CM., Cook, WA., McCarthy, N., Bransbury, AJ., Church, MRT., Church, JCT. (2004). Olfactory detection of human bladder cancer by dogs: proof of principle study. *British Medical Journal*. 329: 712 – 716.
- [103]. Zalar, P., De Hoog, GS., Schroers, HJ., Crous, PW., Groenewald, JZ., Gunde-Cimerman, N. (2007). Phylogeny and ecology of the ubiquitous saprobe *Cladosporium sp* with descriptions of seven new species from hypersaline environments. *Studies in Mycology*. 58: 157 – 183.
- [104]. Zielinska-Jankiewicz, K., Kozajda, A., Piotrowska, M., Szadkowska-Stanczyk, I. (2008). Microbiological contamination with molds in work environment in libraries and archive storage facilities. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 15 (1): 71 – 78.

WEBGRAFIA

- [1]. Naciones Unidas. <http://www.un.org/es/index.html>
- [2]. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. <http://www.fao.org/home/es/>
- [3]. Organización Mundial de la Salud. <http://www.who.int/es/>
- [4]. NIST Chemistry Web Book. <http://webbook.nist.gov/chemistry/>
- [5]. Wiley Online Library. <http://onlinelibrary.wiley.com/>

ANNEXES

- *Curriculum vitae* acadèmic i professional de l'autor.

Lluís Pons Anglada

05/01/1988

Luis.PonsAn@gmail.com

EXPERIÈNCIA PROFESSIONAL

- Generalitat de Catalunya, Departament de Salut (abril 2014 – actualitat). Servei veterinari oficial d'escorxador.
- Consulta Veterinària VetRoda (maig 2014 – actualitat). Veterinari clínic de petits animals.
- *Wisely Instinct Training SL* (octubre 2015 – maig 2016). Veterinari clínic de petits animals i docent en cursos de formació d'auxiliars tècnics veterinaris i ensinistradors canins.
- NOEL Alimentària SAU, Departament de Qualitat (març 2013 – setembre 2013). Analista de laboratori físico-químic i microbiològic.
- Universitat Autònoma de Barcelona, Escola de Prevenció i Seguretat Integral (octubre 2012 – octubre 2014). Docent del Màster en Instrucció d'Unitats Canines de Treball i del Curs d'Ensinistrament Caní Avançat.

FORMACIÓ UNIVERSITÀRIA

- Programa de Doctorat en Microbiologia (2014 – 2016). Universitat Autònoma de Barcelona.
- Màster Oficial en Biotecnologia Alimentària (2013). Universitat de Girona.
- Màster en Instrucció d'Unitats Canines de Treball (2012). Universitat Autònoma de Barcelona.
- Llicenciatura en Veterinària (2006 – 2011). Universitat Autònoma de Barcelona.

PUBLICACIONS

- Pons Anglada, LL., Calvo Torras, MA. (2016). Gossos de detecció més enllà dels narcòtics i els explosius. *Revista de l'Acadèmia de Ciències Veterinàries de Catalunya*. En premsa.
- Pons Anglada, LL. Calvo Torras, MA. (2016). Study of the resistance of *Penicillium rugulosum* and *Trichoderma viride* strains to osmotic, thermal and ultrasound treatments. *British Journal of Microbiology Research*. En premsa.
- Pons Anglada, LL., Calvo Torras, MA. (2016). Detection of *Verticillium dahliae* in olive groves using biodetection canine units. *Agricultural Science*, 7, 225 – 229.
- Pons Anglada, LL., Calvo Torras, MA. (2016). Unitats Canines en Odorologia: usos actuals i noves perspectives. *Raed Tribuna Plural*. En premsa.
- Pons Anglada, LL., Pera Contreras, A., Calvo Torras, MA. (2015). Detección de *Verticillium dahliae* mediante Unidades Caninas de Biodetección. *El Aceite de Oliva. Comunicaciones presentadas al XVII Simposio Científico-Técnico de Expoliva 2015*. ISBN 978-84-938900-5-6.

DIRECCIÓ DE PROJECTES

- Direcció de la tesina del postgrau Instrucció d'Unitats Canines de Treball (curs 2013 – 2014) de l'alumne Dídac Segura Muñoz sota el títol “Detecció de mostres de pèl de Linx Boreal mitjançant unitats canines de biodetecció” i amb una qualificació d'excel·lent (9). Universitat Autònoma de Barcelona, Escola de Prevenció i Seguretat Integral.
- Direcció de la tesina del postgrau Instrucció d'Unitats Canines de Treball (curs 2013 – 2014) de l'alumne Alfonso Pera Contreras sota el títol “Biodetecció mitjançant unitats canines de treball de *Verticillium dahliae* a l'olivera” i amb una qualificació d'excel·lent (9). Universitat Autònoma de Barcelona, Escola de Prevenció i Seguretat Integral.

CONTRIBUCIONS A CONGRESSOS I TAULES RODONES

- Pons Anglada, Ll., Calvo Torras, MA. (2016). Detección de hongos de interés agrícola mediante unidades caninas. Pòster. *XVIII Congreso Nacional de Micología* (Lleida).
- Pons Anglada, Ll., Calvo Torras, MA. (2016). Gossos de detecció més enllà dels narcòtics i els explosius. Ponència. *Acadèmia de Ciències Veterinàries de Catalunya* (Barcelona).
- Pons Anglada, Ll., Gallardo Chacón, JJ., Calvo Torras, MA. (2016). Determinació de compostos orgànics volàtils d'origen fúngic mitjançant SPME-GC-MS. Pòster. *Jornada de Microbiologia, Societat Catalana de Biologia* (Barcelona).
- Pons Anglada, Ll., Fernández Castro, J., Calvo Torras, MA. (2016). Unitats Canines d'Olorologia: usos actuals i noves perspectives. Ponència. *Reial Acadèmia Europea de Doctors* (Barcelona).
- Pons Anglada, Ll. & Calvo Torras, MA. (2014). Detección de compuestos orgánicos volátiles elaborados por hongos mediante Unidades Caninas de Biodetección. Pòster. *XVII Congreso Nacional de Micología* (Bilbao).
- Pons Anglada, Ll., Olivé Andreu, M., Girmé Vila, G., Calvo Torras, MA. (2012). Estudio de la resistencia de cepas de *Penicillium rugulosum* a tratamientos osmóticos, térmicos y a ultrasonidos. Pòster. *XVI Congreso Nacional de Micología* (Cádiz).

TRIBUNALS

- Tribunal de la defensa de tesines del postgrau Instrucció d'Unitats Canines de Treball (maig 2014). Universitat Autònoma de Barcelona, Escola de Prevenció i Seguretat Integral.

ACREDITACIONS

- Acreditació del Ministerio de Interior com a docent per cursos de Guies Canins per la Seguretat Pública i Privada.
- Acreditació de la Generalitat de Catalunya de les següents unitats de competència relacionades amb l'ensinistrament d'Unitats Canines d'Assistència:
 - o Ensinistrar gossos amb tècniques d'ensinistrament de base.
 - o Seleccionar, preparar el cadell i/o integrar gossos externs a la línia de cria per ser ensinistrats com a gossos d'assistència.
 - o Ensinistrar i vincular gossos d'alerta mèdica per persones amb discapacitat i crisis recurrents de desconexió sensorial.
 - o Ensinistrar i vincular gossos de servei per persones amb discapacitat física i problemes de mobilitat.

REVISIÓ D'ARTICLES

- Revisió de l'article titulat "Microbial analyses of second hand sweaters in Wurukum and Wadata markets in Makurdi Metropolis" per la revista *Annual Research and Review in Biology*. En premsa.

FORMACIÓ COMPLEMENTÀRIA

- Acupuntura Veterinària. (2015). Universitat Autònoma de Barcelona.
- Immunologia Clínica Veterinària. (2014). ASIS Formació.
- Microbiologia dels Aliments. (2014). Universidad de Salamanca.
- Jornada sobre Bioplaguicides i Biofertilitzants Microbians. (2013). Universitat de Girona.

- Introducció als protocols de recerca de restes humanes i cadàvers amb Unitats Canines de Treball. (2012). Universitat Autònoma de Barcelona.
- Gossos de detecció per la investigació científica: una guia pel disseny experimental basada en la detecció olfactiva canina del càncer humà. (2012). Universitat Autònoma de Barcelona.
- Introducció a l'ensinistrament del gos d'alerta mèdica per la detecció d'hipoglucèmies. (2012). Universitat Autònoma de Barcelona.
- Curs d'introducció a l'ensinistrament caní. (2012). Universitat Autònoma de Barcelona.
- Congrés de Reproducció i Pediatria Animals. (2011). IVSA Barcelona.
- Jornades de Foment de l'Emprenedoria: Veterinària Emprèn. (2011). Xarxa d'Emprenedoria Universitària. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Jornades de Clínica de Petits Animals (2011). IVSA Barcelona.
- Actualització i formació en clínica veterinària. (2010): Consulta Veterinària.
- Curs de Medicina i Cirurgia Equina. (2010). GEAC Barcelona.
- Actualització i formació en Clínica Veterinària. (2010). Consulta Veterinària.
- Jornades d'etologia. (2010). IVSA Barcelona.
- Actualització i formació en clínica veterinària. (2009): Consulta Veterinària.
- Fauna europea amenaçada. (2009). AVAFES Barcelona.
- Projectes de recuperació i reintroducció de fauna salvatge. (2008). AVAFES Barcelona.

VOLUNTARIAT

- President de l'associació "*Dogs and Jobs for Conservation and Support*" (2016 - actualitat).
- Veterinari de l'associació "Un Munt de Petjades: Agrupació per la Defensa i Tinença responsable d'Animals" (2015 – actualitat).