

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA TERRA,
DELL'AMBIENTE E DELLA VITA (DISTAV)

Classe delle Lauree Magistrali in Biologia LM/6

Corso di Laurea Magistrale in
Biologia Applicata e Sperimentale
Curriculum Forense

Colonizzazione fungina di materiali tessili: analisi delle comunità micologiche con possibili
applicazioni forensi

Laureanda:
Alessia Nicolosi

Relatore:
Professoressa Mirca Zotti
Relatore esterno:
Dottor Marco Iannaccone
Correlatore:
Professor Stefano Vanin

ANNO ACCADEMICO 2025-2026

RIASSUNTO

La colonizzazione fungina dei materiali tessili rappresenta un fenomeno biologico complesso determinato dall'interazione tra le caratteristiche chimico-fisiche del substrato, le condizioni ambientali e l'attività dei microrganismi. Tra questi, i funghi filamentosi rivestono un ruolo di particolare importanza grazie alla capacità di colonizzare materiali di diversa natura e, in condizioni favorevoli, contribuire alla loro alterazione mediante crescita miceliale, produzione di metaboliti ed enzimi extracellulari. Sebbene tali fenomeni siano ampiamente studiati nell'ambito della conservazione dei beni culturali e dei materiali industriali, negli ultimi anni hanno acquisito crescente interesse anche nella biologia e nella micologia forense, poiché la caratterizzazione della componente fungina associata a un reperto può fornire informazioni complementari sulle condizioni di esposizione, conservazione e trasformazione post-deposizionale dei materiali.

La presente tesi ha avuto come obiettivo lo studio della colonizzazione fungina di differenti materiali tessili di potenziale interesse forense, attraverso la caratterizzazione degli isolati associati a substrati di diversa natura e con differenti storie ambientali e conservative. Particolare attenzione è stata rivolta al possibile valore interpretativo dell'insieme dei taxa recuperati, piuttosto che alla presenza di singoli generi o specie, spesso caratterizzati da un'ampia distribuzione ambientale. Sono stati analizzati quattro campioni: una camicia di cotone, una cintura di cuoio, un tessuto sintetico appartenente a un copridivano e un tessuto sintetico proveniente da un ombrellone. La camicia di cotone collocata all'interno di una busta di plastica è stata interrata per circa un anno presso l'Orto Botanico dell'Università di Genova; la cintura è stata conservata per circa un anno in un armadio domestico; il copridivano proveniva da una cantina privata umida e scarsamente ventilata; il tessuto dell'ombrellone proveniva, invece, da un ambiente costiero ed era stato esposto agli agenti atmosferici.

Le modalità di campionamento sono state adattate alle caratteristiche dei diversi materiali. I prelievi sono stati effettuati mediante tamponi sterili, aghi sterili e, quando necessario, attraverso l'asportazione diretta di frammenti di materiale. I microrganismi fungini sono stati isolati su differenti terreni di coltura e gli isolati ottenuti sono stati sottoposti a caratterizzazione macro- e micro-morfologica. L'identificazione è stata ulteriormente approfondita mediante analisi molecolare comprendente estrazione del DNA, amplificazione e sequenziamento della regione *Internal Transcribed Spacer* (ITS) e confronto delle sequenze ottenute con quelle disponibili nel database *GenBank* mediante BLAST.

L'integrazione delle osservazioni morfologiche e dell'analisi della regione ITS hanno evidenziato la presenza di isolati riconducibili ai generi *Alternaria*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Humicola*, *Mucor*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Stachybotrys* e *Trichoderma*. Le migliori corrispondenze ottenute mediante BLAST hanno incluso *Alternaria brassicae*, *A. infectoria*, *Cladosporium eucommiae*, *C. halotolerans*, *Curvularia pseudolunata*, *Fusarium acuminatum*, *F. oxysporum*, *Humicola fuscoatra*, *Mucor circinelloides*, *Penicillium citrinum*, *P. dipodomyicola*, *P. elantae*, *Pestalotiopsis maculiformans*, *Stachybotrys chlorohalonatus*, *Trichoderma erinaceum*, *T. harzianum*, *T. koningiopsis*, *T. koningii* e *T. longibrachiatum*. Poiché il potere discriminante della regione ITS varia tra i diversi gruppi fungini e alcuni risultati erano caratterizzati da percentuali di identità o coperture non ottimali, le attribuzioni a livello di specie devono essere considerate con differente grado di affidabilità e, nei casi meno supportati, come migliori corrispondenze molecolari disponibili.

La struttura della collezione di isolati identificati è stata, inoltre, descritta mediante la ricchezza tassonomica osservata e gli indici di Shannon e Simpson. Tra gli isolati recuperati nelle condizioni sperimentali adottate, il tessuto dell'ombrellone ha presentato la maggiore ricchezza osservata e i valori più elevati di entrambi gli indici, mentre il copridivano ha mostrato i valori più bassi. Tali misure sono state utilizzate esclusivamente con finalità descrittiva ed esplorativa, poiché il numero e la distribuzione dei punti di prelievo differivano tra i campioni e le frequenze degli isolati selezionati non rappresentano necessariamente le abbondanze dei taxa nelle comunità originarie. I valori ottenuti non consentono pertanto confronti statistici inferenziali né possono essere interpretati come stime esaustive della biodiversità fungina dei reperti.

I risultati documentano la colonizzazione dei materiali esaminati da parte di una componente fungina eterogenea e suggeriscono che la sua interpretazione debba integrare la composizione degli isolati recuperati, la loro distribuzione nei punti di prelievo, le caratteristiche del substrato e la storia ambientale e conservativa del campione. La presenza di funghi e di alterazioni macroscopiche compatibili con la colonizzazione non dimostra, tuttavia, la degradazione diretta delle fibre, che richiederebbe specifiche analisi chimiche, strutturali o funzionali dei materiali. Lo studio evidenzia il potenziale della micologia come disciplina complementare nell'analisi dei reperti tessili e fornisce una base esplorativa per futuri approfondimenti. Questi dovranno prevedere campionamenti standardizzati, adeguati controlli ambientali e sperimentali, repliche biologiche, tecniche di sequenziamento ad alta processività e analisi quantitative del materiale, al fine di definire più rigorosamente possibile la composizione delle comunità fungine e valutarne le possibili applicazioni in ambito forense.

La ricerca è stata svolta presso il Laboratorio di Micologia del DISTAV e i ceppi più significativi sono stati depositati nella Collezione ColD UNIGE MIRRI-ERIC.

ABSTRACT

Fungal colonization of textile materials is a complex phenomenon resulting from the interaction between the physicochemical properties of the substrate, environmental conditions, and microbial activity. Filamentous fungi are of particular interest because of their ability to colonize materials of different composition and, under favourable conditions, contribute to their alteration through mycelial growth and the production of metabolites and extracellular enzymes. Although these processes have mainly been investigated in the conservation of cultural heritage and industrial material, they have recently received increasing attention in forensic biology and forensic mycology. The characterization of the fungal component associated with an evidential item may provide complementary information about its exposure, storage conditions, and post-depositional history.

The aim of this thesis was to investigate fungal colonization and biodeterioration of textile materials of potential forensic interest by characterizing isolates associated with substrates of different composition, and environmental, and storage histories. Attention was given to the potential interpretative value of the overall assemblage of recovered taxa rather than to the occurrence of individual genera or species, many of which are widely distributed in the environment. Four materials were examined: a cotton shirt, a leather belt, a synthetic sofa-cover fabric, and a synthetic umbrella fabric. The cotton shirt was placed inside a plastic bag and buried for approximately one year at the Botanical Garden of the University of Genoa; the leather belt was stored for approximately one year in a household wardrobe; the sofa-cover fabric originated from a damp and poorly ventilated private basement; and the beach-parasol fabric originated from a coastal environment and had been exposed to outdoor weathering.

Sampling procedures were adapted to the characteristics of the different materials. Samples were collected using sterile swabs, sterile, and needles, and when necessary, by directly removing fragments of material. Fungal microorganisms were isolated on different culture media, and the resulting isolates were characterized through macro- and micromorphological observations. Identification was further investigated through DNA extraction, amplification and sequencing of the Internal Transcribed Spacer (ITS) region, and comparison of the resulting sequences with those available in the GenBank database using BLAST.

The integration of morphological observations and ITS sequence analysis revealed isolates belonging to the genera *Alternaria*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Humicola*, *Mucor*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Stachybotrys*, and *Trichoderma*. The closest BLAST matches included *Alternaria brassicae*, *A. infectoria*, *Cladosporium eucommiae*, *C. halotolerans*,

Curvularia pseudolunata, *Fusarium acuminatum*, *F. oxysporum*, *Humicola fuscoatra*, *Mucor circinelloides*, *Penicillium citrinum*, *P. dipodomyicola*, *P. elantae*, *Pestalotiopsis maculiformans*, *Stachybotrys chlorohalonatus*, *Trichoderma erinaceum*, *T. harzianum*, *T. koningiopsis*, *T. koningii*, and *T. longibrachiatum*. Because the discriminatory power of the ITS region varies among fungal groups and some results showed suboptimal identity percentages or sequence coverage, species-level assignments should be regarded as having different degrees of confidence and, in the less strongly supported cases, as the closest available molecular matches. The structure of the identified isolate collection was further described using observed taxonomic richness and the Shannon and Simpson indices. Among the isolates recovered under the experimental conditions adopted in this study, the beach-parasol fabric showed the highest observed richness and the highest values for both indices, whereas the sofa-cover fabric showed the lowest values. These measures were used exclusively for descriptive and exploratory purposes because the number and distribution of sampling points differed among the materials and the frequencies of the selected isolates do not necessarily represent the relative abundances of taxa in the original communities. The resulting values therefore do not support inferential statistical comparisons and should not be interpreted as comprehensive estimates of the actual fungal biodiversity of the examined materials.

The results document the colonization of the examined materials by a heterogeneous fungal component and suggest that its interpretation should integrate the composition of the recovered isolates, their distribution among sampling sites, substrate characteristics, and the environmental and storage history of each material. However, the occurrence of fungi and macroscopically visible alterations compatible with fungal colonization does not in itself demonstrate direct degradation of the fibres, which would require specific chemical, structural, or functional analyses of the materials.

This study highlights the potential of mycology as a complementary discipline in the examination of textile evidence and provides an exploratory basis for further investigation. Future studies should include standardized sampling procedures, appropriate environmental and experimental controls, biological replicates, high-throughput sequencing technologies, and quantitative analyses of material deterioration to characterize fungal communities more rigorously and assess their possible forensic applications.

The research was conducted at the Mycology Laboratory, located on the fourth floor of the Palazzo delle Scienze, DISTAV – Department of Earth, Environment and Life Sciences, University of Genoa.

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
<i>1.1 Biodeterioramento fungino: principi generali</i>	<i>1</i>
<i>1.2 Classificazione dei materiali tessili</i>	<i>5</i>
1.2.1 Cotone	6
1.2.2 Cuoio	8
1.2.3 Fibre sintetiche	10
<i>1.3 Confronto della degradazione fungina nei diversi materiali tessili</i>	<i>13</i>
<i>1.4 Applicazioni forensi della degradazione fungina nei materiali tessili</i>	<i>15</i>
2. SCOPO DELLA TESI	20
3. MATERIALI E METODI	21
<i>3.1 Campioni e Campionamento</i>	<i>21</i>
<i>3.2 Terreni di coltura e preparazione</i>	<i>26</i>
<i>3.3 Campionamento e preparazione delle piastre madri</i>	<i>29</i>
<i>3.4 Isolamento in coltura pura</i>	<i>30</i>
<i>3.5 Identificazione macro- e micro-morfologica</i>	<i>32</i>
<i>3.6 Conservazione degli isolati fungini: DNA stock e CRYO stock</i>	<i>33</i>
<i>3.7 Identificazione molecolare</i>	<i>38</i>
3.7.1 Estrazione del DNA	38
3.7.2 Amplificazione mediante PCR	41
3.7.3 Sequenziamento e identificazione dei generi fungini	43
<i>3.8 Metodi per la valutazione della diversità fungina</i>	<i>44</i>
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	48
<i>4.1 Camicia di cotone</i>	<i>52</i>
<i>4.2 Cintura di cuoio</i>	<i>58</i>
<i>4.3 Tessuto copridivano sintetico</i>	<i>62</i>
<i>4.4 Ombrellone di fibre sintetiche</i>	<i>65</i>
<i>4.5 Analisi della diversità degli isolati fungini</i>	<i>70</i>
<i>4.6 Discussione dei taxa fungini identificati</i>	<i>73</i>
4.6.1 <i>Alternaria</i>	74
4.6.2 <i>Cladosporium</i>	76
4.6.3 <i>Curvularia</i>	79
4.6.4 <i>Fusarium</i>	81

4.6.5 <i>Humicola</i>	84
4.6.6 <i>Mucor</i>	86
4.6.7 <i>Penicillium</i>	88
4.6.8 <i>Pestalotiopsis</i>	91
4.6.9 <i>Stachybotrys</i>	92
4.6.10 <i>Trichoderma</i>	94
4.7 <i>Interpretazione integrata dei risultati e implicazioni forensi</i>	97
4.7.1 Influenza del substrato e del microambiente	98
4.7.2 Colonizzazione superficiale e degradazione diretta	100
4.7.3 Interpretazione forense delle comunità fungine associate ai campioni	102
5. CONCLUSIONI	108
6. BIBLIOGRAFIA	111

1. INTRODUZIONE

1.1 Biodeterioramento fungino: principi generali

Il biodeterioramento comprende l'insieme delle modificazioni indesiderate delle proprietà di un materiale determinate dall'attività vitale degli organismi. Tali modificazioni possono interessare inizialmente l'aspetto superficiale, attraverso fenomeni quali discolorazione e formazione di macchie, fino a determinare alterazioni fisiche e chimiche più profonde e, nei casi più avanzati, la compromissione dell'integrità del substrato. Il termine si distingue dalla biodegradazione, più propriamente riferita alla degradazione della materia organica operata dagli organismi decompositori, e dal biofouling, che indica invece la crescita indesiderata di organismi su una superficie, non necessariamente accompagnata da un effettivo deterioramento del materiale (Gadd et al., 2024). Il biodeterioramento rappresenta pertanto un fenomeno dinamico e multifattoriale, la cui insorgenza e progressione dipendono dall'interazione tra le caratteristiche biologiche dei microrganismi, la natura chimico-fisica del substrato e le condizioni ambientali. La composizione del materiale, il microclima e le condizioni di esposizione contribuiscono congiuntamente a determinare la suscettibilità alla colonizzazione e le modalità con cui il processo degradativo può evolvere. Non tutti i materiali risultano infatti ugualmente suscettibili e la presenza di microrganismi su una superficie non implica necessariamente che sia in atto un processo di biodeterioramento (Gadd et al., 2024). La natura e la composizione chimica del materiale, le caratteristiche macro- e microclimatiche e le condizioni di gestione e ventilazione costituiscono alcune delle principali categorie di fattori capaci di influenzare il fenomeno.

Tra gli agenti biologici coinvolti, i funghi rivestono un ruolo di particolare importanza. La loro diffusione ubiquitaria, la capacità di colonizzare substrati di natura estremamente diversa e la possibilità di persistere anche in condizioni ambientali sfavorevoli contribuiscono alla loro rilevanza come agenti di biodeterioramento. I funghi filamentosi possiedono inoltre una modalità di crescita esplorativa e penetrativa basata sullo sviluppo delle ife, che favorisce la colonizzazione delle superfici solide e l'accesso alle risorse disponibili. Numerose specie sono in grado di tollerare condizioni di disidratazione, radiazione ultravioletta, salinità, limitata disponibilità di nutrienti e presenza di sostanze potenzialmente tossiche, mentre la produzione di strutture resistenti ne favorisce la persistenza durante periodi caratterizzati da condizioni sfavorevoli (Gadd et al., 2024). La crescita ifale rappresenta uno dei principali elementi alla base dell'interazione tra fungo e substrato. L'espansione del micelio consente infatti la colonizzazione della superficie e, qualora le caratteristiche strutturali del materiale lo permettano, la penetrazione al suo interno. Il processo non determina esclusivamente una modificazione fisica del substrato, ma consente anche al fungo di

esplorare il microambiente e raggiungere nuove fonti nutritive. I meccanismi di biodeterioramento dipendono dalla natura del materiale, ma la crescita filamentosa e il metabolismo chemoorganotrofo rappresentano caratteristiche comuni nell'interazione dei funghi con numerosi substrati (Gadd et al., 2024). La capacità di penetrazione delle ife è stata confermata anche sperimentalmente: Gadd e McGregor (2024), analizzando la colonizzazione di substrati cementizi da parte di differenti specie fungine, hanno evidenziato fenomeni di penetrazione, erosione superficiale e modificazione della matrice associati alla crescita fungina. Sebbene tali osservazioni siano riferite a un materiale specifico, esse dimostrano come lo sviluppo miceliale possa esercitare un'azione fisica diretta sul substrato e come le caratteristiche strutturali del materiale possano condizionare la modalità di penetrazione (Gadd & McGregor, 2024).

All'azione meccanica si affianca l'attività biochimica. Il metabolismo fungino è di tipo chemoorganotrofo e comporta l'interazione con l'ambiente circostante attraverso l'assorbimento di nutrienti e il rilascio di differenti sostanze extracellulari. I funghi sono in grado di produrre enzimi che agiscono sui componenti del substrato, rendendo disponibili molecole successivamente utilizzabili per il metabolismo cellulare. I sistemi enzimatici coinvolti variano in relazione al microrganismo e alla composizione del materiale e possono comprendere differenti enzimi idrolitici capaci di intervenire sulla degradazione di macromolecole organiche (Angeles Flores et al., 2026; Gadd et al., 2024). Nei materiali organici, la penetrazione ifale e l'attività enzimatica possono agire congiuntamente, determinando una progressiva perdita della coesione strutturale del substrato.

Oltre agli enzimi extracellulari, il metabolismo fungino può determinare il rilascio di protoni, acidi organici e altri metaboliti capaci di modificare localmente le caratteristiche chimiche del microambiente (Gadd et al., 2024). La produzione di acidi organici può contribuire alla modificazione del pH e favorire trasformazioni chimiche del materiale, mentre la sintesi di pigmenti può essere responsabile della comparsa di alterazioni cromatiche. Numerosi funghi producono infatti pigmenti localizzati nelle pareti cellulari o rilasciati extracellularmente e alcune specie melanizzate possono determinare annerimenti e macchie che riflettono la distribuzione della colonizzazione sulla superficie (Gadd et al., 2024). Analogamente, nei materiali organici sono stati descritti processi degradativi associati alla combinazione di penetrazione meccanica, secrezione di enzimi idrolitici, produzione di acidi organici e metaboliti pigmentati (Angeles Flores et al., 2026).

La colonizzazione fungina ha generalmente origine dalla deposizione di propaguli sulla superficie. L'efficiente dispersione delle spore nell'ambiente, associata alla loro capacità di persistenza, favorisce il contatto dei funghi con numerose tipologie di substrato. Tuttavia, la deposizione di una spora non determina necessariamente una colonizzazione attiva. Quest'ultima richiede che si instaurino condizioni sufficientemente favorevoli alla germinazione e al successivo sviluppo del

micelio. Una volta avvenuta l'adesione, le spore possono produrre il tubo germinativo e dare origine alla crescita ifale, con progressiva espansione sulla superficie (Gadd et al., 2024; Tselepi et al., 2024). Le caratteristiche superficiali del materiale possono influenzare significativamente queste prime fasi. Tselepi et al. (2024) hanno dimostrato sperimentalmente che la proliferazione fungina varia in funzione della natura del materiale, della micro- e nanotopografia e delle proprietà di bagnabilità della superficie. Nel loro modello sperimentale, superfici con differenti caratteristiche hanno determinato variazioni significative nella quantità di biomassa fungina sviluppata, evidenziando che topografia, chimica superficiale e adesione agiscono in maniera combinata nel condizionare la proliferazione del fungo. In particolare, una volta aderite alla superficie, le spore possono sviluppare tubi germinativi, ife e successivamente strutture più organizzate, mentre le caratteristiche di adesione e bagnabilità possono favorire o limitare tale sviluppo (Tselepi et al., 2024).

Con il progredire della colonizzazione, i funghi possono inoltre produrre sostanze polimeriche extracellulari e partecipare alla formazione di biofilm. Queste strutture modificano il microambiente immediatamente circostante e possono contribuire alla ritenzione dell'acqua e all'adesione alla superficie. In condizioni naturali, inoltre, i funghi non sono necessariamente presenti come popolazioni isolate, ma possono essere associati ad altri microrganismi all'interno di comunità più complesse. Ne consegue che il processo di biodeterioramento non deve essere interpretato esclusivamente sulla base dell'attività di una singola specie, ma considerando le interazioni che possono instaurarsi tra differenti organismi e il substrato colonizzato (Gadd et al., 2024).

Le condizioni ambientali rivestono un ruolo fondamentale nel determinare se una contaminazione possa evolvere in una colonizzazione attiva. Tra i fattori maggiormente rilevanti rientrano la disponibilità di acqua, la temperatura, la ventilazione, il tempo di esposizione e la disponibilità di risorse nutritive. In particolare, l'umidità costituisce uno dei principali fattori che controllano lo sviluppo delle muffe negli ambienti indoor. Le linee guida della World Health Organization sottolineano come un'adequata disponibilità di umidità consenta la crescita di numerose specie batteriche e fungine e individuano nella prevenzione dell'umidità persistente uno degli strumenti principali per limitare la proliferazione microbica sulle superfici e nelle strutture degli edifici (Heseltine et al., 2009). Il rapporto tra umidità e crescita fungina non può tuttavia essere ricondotto a un singolo valore soglia valido per ogni situazione. La formazione delle muffe è un processo dipendente dal tempo e risente contemporaneamente dell'umidità relativa, della temperatura e delle caratteristiche del materiale. La WHO evidenzia infatti come differenti materiali possano presentare differenti condizioni critiche e come sia necessario considerare congiuntamente le variazioni microclimatiche e la durata dell'esposizione (Heseltine et al., 2009). La ventilazione interviene

ulteriormente su questo equilibrio, contribuendo alla regolazione dell'umidità presente negli ambienti indoor e alla dispersione dei contaminanti (Heseltine et al., 2009).

Accanto ai parametri ambientali, anche la natura del substrato svolge un ruolo determinante. Composizione chimica, caratteristiche della superficie e stato di conservazione influenzano la possibilità di adesione e sviluppo dei microrganismi. Porosità, rugosità e capacità di trattenere acqua possono, ad esempio, modificare la biorecettività della superficie favorendo la deposizione di propaguli, particolato e nutrienti. Sebbene tali proprietà assumano un peso differente in funzione del materiale considerato, il principio generale rimane quello di una stretta interdipendenza tra caratteristiche del substrato e condizioni ambientali (Gadd et al., 2024).

Anche la presenza di materiale estraneo sulla superficie può modificare la suscettibilità alla colonizzazione. L'accumulo di polvere e residui può infatti rappresentare contemporaneamente una fonte di propaguli microbici e di nutrienti utilizzabili durante le prime fasi della crescita (Gadd et al., 2024). Questo aspetto contribuisce a spiegare perché anche substrati che presentano una limitata disponibilità intrinseca di nutrienti possano essere colonizzati in presenza di condizioni ambientali favorevoli.

Le conseguenze del biodeterioramento possono manifestarsi a differenti livelli. Macroscopicamente possono comparire discolorazioni, macchie, patine e modificazioni dell'aspetto superficiale; a livello strutturale possono invece verificarsi erosione, perdita di coesione, penetrazione ifale e modificazioni fisico-chimiche della matrice. L'entità delle alterazioni dipende dalla combinazione dei meccanismi coinvolti e dalle caratteristiche del sistema considerato. Studi sperimentali hanno dimostrato che l'attività fungina può produrre danni evidenti anche su substrati di natura inorganica, attraverso fenomeni di corrosione superficiale, formazione di depressioni, deposizione di elementi e formazione di prodotti biogenici (Rodrigues et al., 2014). Tale evidenza sottolinea la capacità dei funghi di interagire con materiali chimicamente molto differenti e conferma il carattere trasversale dei meccanismi di biodeterioramento.

È pertanto fondamentale distinguere tra presenza fungina e reale attività biodeteriorativa. Il semplice rinvenimento di spore, conidi o strutture fungine su un materiale non dimostra automaticamente che il microrganismo abbia contribuito alla sua degradazione. Il biofouling può infatti verificarsi anche in assenza di modificazioni significative del substrato, mentre alcune alterazioni osservabili possono derivare da processi esclusivamente abiotici. La valutazione del biodeterioramento richiede quindi di mettere in relazione la presenza e l'attività dei microrganismi con le modificazioni fisiche, chimiche o strutturali effettivamente osservate sul materiale (Gadd et al., 2024).

Nel complesso, il biodeterioramento fungino può essere interpretato come il risultato dell'interazione dinamica tra fungo, substrato e ambiente. Le caratteristiche morfologiche e metaboliche dei funghi

ne favoriscono la dispersione, la colonizzazione e la persistenza su numerose tipologie di superficie, mentre le proprietà del materiale e le condizioni microambientali determinano se tale presenza possa evolvere in crescita attiva e produrre alterazioni significative. La natura del substrato rappresenta quindi una variabile fondamentale nel determinare le modalità con cui la colonizzazione e il deterioramento si manifestano; tali differenze verranno approfondite nei paragrafi successivi in relazione alle diverse tipologie di materiali tessili.

1.2 Classificazione dei materiali tessili

La natura chimica e strutturale del substrato rappresenta un fattore fondamentale nel determinarne le proprietà fisiche, la stabilità e il comportamento nei confronti degli agenti ambientali e biologici. Composizione chimica, morfologia e caratteristiche superficiali possono infatti influenzare l'interazione con l'ambiente e la suscettibilità alla colonizzazione microbica e ai successivi processi di biodeterioramento (Gadd et al., 2024; Tselepi et al., 2024).

I materiali tessili possono essere classificati principalmente in base all'origine e alla composizione delle fibre. Una distinzione generale comprende fibre naturali, fibre rigenerate e fibre sintetiche. Le fibre naturali derivano direttamente da fonti biologiche e comprendono fibre di origine vegetale, caratterizzate prevalentemente da una componente cellulosica, e fibre di origine animale, costituite principalmente da materiale proteico. Le fibre rigenerate sono invece ottenute attraverso la trasformazione e successiva ricostituzione di polimeri di origine naturale, mentre le fibre sintetiche derivano dalla sintesi di polimeri, tra cui poliestere, poliammidi e fibre acriliche (Ali et al., 2026; Eleutério et al., 2025).

Le differenze nella composizione chimica e nell'organizzazione strutturale delle fibre determinano proprietà differenti in termini di assorbimento dell'acqua, resistenza, stabilità e interazione con i microrganismi. Le fibre di origine vegetale sono costituite prevalentemente da cellulosa, accompagnata in proporzioni variabili da emicellulose, lignina e altri componenti, mentre i materiali sintetici sono costituiti da polimeri ottenuti attraverso processi di sintesi chimica. Tali differenze contribuiscono a determinare modalità differenti di colonizzazione e degradazione biologica e devono pertanto essere considerate nello studio del biodeterioramento dei manufatti tessili (Ali et al., 2026; Eleutério et al., 2025).

A queste categorie si affianca il cuoio, che non rappresenta una fibra tessile in senso stretto, ma costituisce un materiale flessibile di origine animale ampiamente utilizzato nella produzione di abbigliamento, calzature e accessori. Il cuoio deriva dalla trasformazione della pelle animale attraverso differenti fasi di lavorazione, tra cui il processo di concia, ed è costituito principalmente da una matrice fibrosa a base di collagene (Chen et al., 2023).

Nel presente studio sono stati analizzati materiali caratterizzati da differente origine e composizione: una camicia di cotone, una cintura di cuoio, un tessuto sintetico appartenente a un copridivano e un tessuto sintetico proveniente da un ombrellone. La loro diversa natura chimica e strutturale rappresenta una variabile rilevante per l'interpretazione della colonizzazione fungina e delle alterazioni osservate. Nei paragrafi successivi verranno pertanto approfondite le principali caratteristiche del cuoio, delle fibre naturali e delle fibre sintetiche, con particolare attenzione agli aspetti che possono influenzarne la suscettibilità alla colonizzazione e al biodeterioramento fungino.

1.2.1 Cotone

Il cotone rappresenta una delle fibre naturali di origine vegetale maggiormente utilizzate nella produzione di indumenti e manufatti tessili grazie alle sue proprietà meccaniche, alla buona traspirabilità e all'elevata capacità di assorbimento dell'umidità. In ambito forense, gli indumenti in cotone costituiscono campioni frequentemente rinvenuti sulla scena del crimine o in associazione a resti umani e, durante la permanenza nell'ambiente, possono andare incontro a processi di biodeterioramento che ne modificano progressivamente le caratteristiche strutturali e meccaniche. La comprensione dei meccanismi che regolano tali processi riveste pertanto particolare interesse per interpretare lo stato di conservazione del campione e l'influenza delle condizioni ambientali sulla sua conservazione (Szostak-Kotowa, 2004).

Dal punto di vista chimico, il cotone è costituito quasi esclusivamente da cellulosa, un polisaccaride formato da lunghe catene lineari di unità di β -D-glucosio unite da legami β -(1 $\rightarrow$ 4)-glicosidici. Le catene di cellulosa si organizzano in microfibrille comprendenti regioni altamente cristalline alternate a regioni amorfe meno ordinate. Tale organizzazione conferisce alla fibra elevate proprietà meccaniche, ma influenza anche la sua suscettibilità ai processi di degradazione biologica. Le regioni amorfe risultano infatti maggiormente accessibili all'azione degli enzimi extracellulari prodotti dai microrganismi, mentre quelle cristalline presentano una maggiore resistenza alla degradazione (Kavkler et al., 2015; Szostak-Kotowa, 2004).

Il biodeterioramento fungino del cotone è strettamente correlato alla capacità di numerosi funghi filamentosi di utilizzare la cellulosa come fonte di carbonio ed energia. Il processo ha generalmente inizio con l'adesione delle spore sulla superficie della fibra e con la successiva germinazione in presenza di condizioni ambientali favorevoli. In una fase iniziale vengono degradati gli strati più superficiali della fibra, compresa la cuticola cerosa che svolge una naturale funzione protettiva. La rimozione di questa barriera rende progressivamente accessibile la cellulosa sottostante, favorendo la penetrazione delle ife e l'avvio della degradazione enzimatica della parete cellulare (Szostak-Kotowa, 2004).

La demolizione della cellulosa è mediata dall'azione sinergica di un complesso di enzimi extracellulari costituito principalmente da endoglucanasi, cellobioidrolasi e β -glucosidasi, che idrolizzano progressivamente le catene polisaccaridiche fino alla liberazione di glucosio utilizzabile dai microrganismi come fonte nutritiva (Angeles Flores et al., 2026; Szostak-Kotowa, 2004). La depolimerizzazione della cellulosa determina una progressiva perdita della coesione tra le microfibrille, con conseguente riduzione della resistenza meccanica della fibra e alterazione della sua integrità strutturale. Studi condotti mediante microscopia elettronica a scansione (SEM), spettroscopia FTIR e spettroscopia Raman hanno evidenziato che tali modificazioni sono associate a fenomeni di idrolisi, depolimerizzazione e riduzione dell'ordine molecolare della cellulosa, accompagnati da una progressiva frammentazione della matrice fibrosa (Kavkler et al., 2015).

La suscettibilità del cotone alla colonizzazione fungina dipende sia dalle caratteristiche intrinseche della fibra sia dalle condizioni ambientali. Essendo un materiale igroscopico, il cotone assorbe facilmente l'umidità ambientale, favorendo la formazione di microambienti idonei alla germinazione delle spore e allo sviluppo del micelio. Elevati valori di umidità relativa, temperature moderate, ventilazione insufficiente e accumulo di polveri o residui organici accelerano significativamente i processi di biodeterioramento (Angeles Flores et al., 2026). Inoltre, sostanze presenti sul tessuto, quali coloranti, appretti, adesivi o altri residui organici, possono costituire ulteriori fonti nutritive che facilitano l'insediamento e la crescita dei microrganismi (Angeles Flores et al., 2026; Szostak-Kotowa, 2004).

Tra i principali agenti fungini coinvolti nel deterioramento del cotone figurano specie appartenenti ai generi *Chaetomium*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Myrothecium*, *Stachybotrys* e *Verticillium*, caratterizzate da una spiccata attività cellulolitica (Szostak-Kotowa, 2004). In particolare, *Aspergillus* e *Penicillium* risultano particolarmente rilevanti poiché sono in grado di svilupparsi anche in condizioni di limitata disponibilità di acqua, creando condizioni favorevoli alla successiva colonizzazione da parte di specie maggiormente degradative. Studi sperimentali hanno inoltre dimostrato che differenti specie fungine determinano livelli diversi di deterioramento: *Cladosporium cladosporioides*, *Fomes fomentarius* e *Hypoxyton fragiforme* provocano una marcata depolimerizzazione della cellulosa e una significativa riduzione della resistenza meccanica delle fibre, mentre *Penicillium chrysogenum* manifesta un'attività degradativa decisamente più contenuta (Kavkler et al., 2015).

Le alterazioni prodotte dal biodeterioramento comprendono discolorazioni, perdita di consistenza, fragilità, erosione superficiale e progressiva riduzione della resistenza meccanica del tessuto. La penetrazione delle ife all'interno della struttura fibrosa determina la comparsa di microfratture che tendono ad ampliarsi durante i cicli di umidificazione ed essiccamento, fino a compromettere

l'integrità del materiale. Parallelamente, numerose specie fungine producono pigmenti e metaboliti secondari, tra cui acidi organici, che favoriscono l'acidificazione locale e la comparsa di macchie persistenti, spesso evidenti prima che il deterioramento strutturale diventi macroscopicamente osservabile (Angeles Flores et al., 2026; Gadd et al., 2024).

Nell'ambito della biologia forense, la conoscenza dei processi di biodeterioramento del cotone assume particolare rilevanza poiché gli indumenti rientrano tra i campioni più frequentemente rinvenuti sulla scena del crimine o in associazione a resti umani. La permanenza dei materiali tessili in differenti condizioni ambientali può influenzarne profondamente lo stato di conservazione, determinando alterazioni morfologiche, meccaniche e microbiologiche che modificano progressivamente il campione.

Nel presente studio, il biodeterioramento fungino è stato valutato utilizzando una camicia di cotone conservata all'interno di una busta di plastica, al fine di simulare un microambiente caratterizzato da elevata umidità e ridotta ventilazione, condizioni che possono verificarsi quando un indumento rimane confinato per un periodo prolungato in un involucro plastico o in altri ambienti chiusi. L'analisi della colonizzazione fungina e delle alterazioni del tessuto in questo modello sperimentale consente di approfondire le dinamiche del biodeterioramento in condizioni ambientali controllate e di valutarne le possibili implicazioni nell'interpretazione dello stato di conservazione dei campioni tessili di interesse forense.

1.2.2 Cuoio

Il cuoio rappresenta un materiale di origine animale ampiamente impiegato nella produzione di indumenti, calzature, accessori e numerosi manufatti di interesse storico e culturale. Nell'ambito della biologia forense riveste particolare interesse poiché è frequentemente presente tra i campioni rinvenuti sulla scena del crimine o associati a resti umani e, durante la permanenza nell'ambiente, può andare incontro a processi di alterazione fisica, chimica e biologica che ne modificano progressivamente le caratteristiche originarie. La comprensione dei meccanismi che regolano tali processi risulta quindi fondamentale per interpretarne lo stato di conservazione e valutare l'influenza delle condizioni ambientali sul campione (Szostak-Kotowa, 2004).

Il cuoio deriva dalla trasformazione della pelle animale mediante il processo di concia, finalizzato a stabilizzare il derma e a rallentarne la degradazione naturale. Il derma rappresenta infatti la porzione della pelle maggiormente utilizzata per la produzione del cuoio grazie all'elevata concentrazione di collagene, una proteina fibrosa organizzata in una complessa rete tridimensionale che conferisce al materiale resistenza meccanica, elasticità e flessibilità. A differenza delle comuni fibre tessili, il cuoio non è costituito da elementi filamentosi distinti, ma da una matrice continua di fibre di collagene

intrecciate, la cui organizzazione influenza direttamente le proprietà fisiche del materiale e la sua risposta ai processi di deterioramento (Szostak-Kotowa, 2004).

Durante la concia vengono introdotte sostanze in grado di stabilizzare la matrice di collagene attraverso la formazione di nuovi legami con le fibre di collagene. I processi maggiormente impiegati comprendono la concia al cromo e la concia vegetale, che consentono di aumentare la resistenza del materiale nei confronti della degradazione biologica e chimica. Tuttavia, nonostante tali trattamenti, il cuoio mantiene la natura di substrato organico e può andare incontro a fenomeni di invecchiamento e biodeterioramento quando esposto a condizioni ambientali favorevoli (Szostak-Kotowa, 2004).

Il biodeterioramento fungino del cuoio è strettamente correlato alla composizione proteica della matrice di collagene. Le spore fungine, ubiquitariamente presenti nell'ambiente, possono depositarsi sulla superficie del materiale e, in presenza di adeguati livelli di umidità, germinare dando origine alle ife, che penetrano progressivamente tra le fibre di collagene. La degradazione è mediata principalmente dalla produzione di enzimi extracellulari, in particolare proteasi e collagenasi, capaci di idrolizzare il collagene e di alterare progressivamente l'organizzazione della matrice fibrosa. Parallelamente, la produzione di metaboliti secondari e di acidi organici contribuisce a modificare il microambiente circostante, favorendo ulteriormente l'attività degradativa (Abdel-Maksoud et al., 2022a; Gadd et al., 2024).

La suscettibilità del cuoio alla colonizzazione fungina dipende dall'interazione tra le caratteristiche intrinseche del materiale e le condizioni ambientali. Essendo un materiale igroscopico, il cuoio è in grado di assorbire e rilasciare umidità in funzione delle variazioni microclimatiche. Elevati valori di umidità relativa, temperature moderate, ventilazione insufficiente e accumulo di polveri o residui organici favoriscono la germinazione delle spore e la crescita del micelio, accelerando i processi di biodeterioramento (Angeles Flores et al., 2026). Inoltre, l'invecchiamento naturale del materiale, associato a fenomeni di ossidazione e idrolisi del collagene, rende progressivamente la matrice più vulnerabile all'azione enzimatica dei microrganismi (Abdel-Maksoud et al., 2022a).

Tra i principali microrganismi coinvolti nel deterioramento del cuoio figurano specie appartenenti ai generi *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium* e *Alternaria*, caratterizzate da elevata capacità adattativa e da una spiccata attività proteolitica (Angeles Flores et al., 2026; Gadd et al., 2024). La loro crescita determina alterazioni macroscopiche quali discolorazioni, irrigidimento, perdita di elasticità, screpolature e odori sgradevoli, accompagnate da profonde modificazioni della matrice di collagene. Studi condotti mediante microscopia elettronica a scansione (SEM) hanno evidenziato la capacità delle ife fungine di penetrare tra le fibre di collagene provocandone la progressiva frammentazione, mentre tecniche spettroscopiche quali FTIR e Raman consentono di monitorare le alterazioni chimiche associate ai processi degradativi (Abdel-Maksoud et al., 2022a).

Nell'ambito della biologia forense, il cuoio rappresenta un materiale di particolare interesse poiché è frequentemente presente in campioni quali cinture, calzature, borse e altri manufatti rinvenuti sulla scena del crimine o in associazione a resti umani. Nel presente studio, il biodeterioramento fungino è stato analizzato utilizzando una cintura di cuoio, scelta come modello sperimentale per valutare le alterazioni microbiologiche e strutturali che questo materiale può subire durante la permanenza in differenti condizioni ambientali. La caratterizzazione delle specie fungine colonizzanti e delle modificazioni indotte sulla matrice di collagene può contribuire alla valutazione dello stato di conservazione del campione e alla comprensione delle interazioni tra materiale, microrganismi e ambiente. Sebbene tali alterazioni non consentano, allo stato attuale delle conoscenze, una stima diretta dell'intervallo post-mortale o del tempo di permanenza del campione, il loro studio rappresenta un importante presupposto per approfondire il potenziale impiego del biodeterioramento fungino nell'interpretazione dei campioni di interesse forense.

1.2.3 Fibre sintetiche

Le fibre sintetiche sono materiali ottenuti mediante processi di sintesi chimica che portano alla formazione di polimeri ad elevato peso molecolare, ampiamente utilizzati nella produzione di indumenti, rivestimenti, tessuti tecnici e manufatti destinati all'arredamento. A differenza delle fibre naturali, i polimeri che le costituiscono non rappresentano normalmente una fonte diretta di nutrienti per i microrganismi.

Tra le fibre sintetiche maggiormente utilizzate nel settore tessile rientrano il poliestere, le poliammidi, il polipropilene, il poliuretano e le fibre acriliche, ciascuna caratterizzata da proprietà chimico-fisiche che ne determinano il comportamento durante l'impiego e la conservazione. Il poliestere, rappresentato principalmente dal polietilene tereftalato (PET), costituisce una delle fibre più diffuse grazie all'elevata resistenza meccanica, alla stabilità dimensionale, alla ridotta igroscopicità e alla buona resistenza agli agenti chimici. Le poliammidi, come il nylon, presentano elevata elasticità e resistenza all'abrasione, oltre a una maggiore capacità di assorbire umidità rispetto al poliestere.

Il polipropilene è caratterizzato da una struttura altamente idrofobica, da un basso peso specifico e da un'elevata inerzia chimica, proprietà che ne limitano generalmente la suscettibilità al biodeterioramento. Le fibre poliuretatiche, comunemente note come elastan o spandex, possiedono un'elevata elasticità e vengono frequentemente impiegate in miscela con altre fibre per migliorarne la vestibilità; la presenza di gruppi uretanici ed esterei può tuttavia renderle più vulnerabili a fenomeni di idrolisi rispetto ad altri polimeri sintetici. Le fibre acriliche, costituite prevalentemente da poliacrilonitrile, vengono utilizzate come sostituti della lana grazie alla loro leggerezza, al buon isolamento termico e alla discreta resistenza agli agenti atmosferici.

La diversa composizione chimica di questi materiali influenza non solo le loro proprietà tecnologiche, ma anche la risposta ai processi di invecchiamento ambientale e alla successiva colonizzazione microbica. Rispetto alle fibre naturali, esse presentano generalmente maggiore stabilità chimica, resistenza meccanica e minore suscettibilità alla degradazione biologica, proprietà che dipendono dalla composizione del polimero, dal peso molecolare, dal grado di cristallinità e dai trattamenti applicati durante la produzione (Szostak-Kotowa, 2004).

La struttura delle fibre sintetiche è costituita da lunghe catene polimeriche organizzate in regioni cristalline, maggiormente ordinate e compatte, e regioni amorfe, meno strutturate e relativamente più accessibili agli agenti chimici e biologici. La presenza di legami esterei, ammidici o uretanici può rendere alcuni polimeri suscettibili a processi di idrolisi chimica o enzimatica, mentre le poliolefine, come il polipropilene, risultano generalmente più resistenti poiché costituite prevalentemente da catene idrocarburiche prive di gruppi funzionali facilmente attaccabili. La suscettibilità al biodeterioramento varia quindi in funzione della natura del materiale: i poliuretani contenenti componenti poliestere possono essere interessati dall'attività di esterasi e proteasi fungine, mentre PET, poliammidi, polipropilene e poliacrilonitrile mostrano generalmente una degradazione più limitata (Szostak-Kotowa, 2004).

Un'ulteriore caratteristica delle fibre sintetiche è la loro natura prevalentemente idrofobica, che limita l'assorbimento dell'acqua e riduce la formazione di condizioni favorevoli alla crescita microbica. Tuttavia, le superfici delle fibre non sono completamente uniformi e possono presentare rugosità, pori, microcavità e irregolarità derivanti dai processi produttivi. Tali caratteristiche aumentano l'area disponibile per l'adesione delle spore fungine e possono favorire le prime fasi della colonizzazione. Anche additivi, lubrificanti, stabilizzanti e pigmenti impiegati durante la fabbricazione possono migrare verso la superficie e modificarne la bagnabilità e le proprietà adesive (Gubała et al., 2020). Il biodeterioramento delle fibre sintetiche ha generalmente inizio con una colonizzazione superficiale. In presenza di adeguati livelli di umidità, le spore fungine possono germinare e produrre ife e sostanze polimeriche extracellulari, favorendo la formazione di biofilm. La matrice extracellulare trattiene acqua e nutrienti e permette ai microrganismi di persistere anche su substrati scarsamente biodegradabili. Nella maggior parte dei casi, infatti, i funghi non utilizzano direttamente il polimero come principale fonte di carbonio, ma sfruttano sostanze organiche accumulate sulla superficie, quali polveri, sebo, cellule epiteliali, residui alimentari, detergenti e altri contaminanti derivanti dall'uso e dall'ambiente di conservazione.

È pertanto necessario distinguere tra biodeterioramento e biodegradazione. Il primo comprende le modificazioni indesiderate delle proprietà estetiche, fisiche o funzionali del materiale provocate dalla colonizzazione biologica, anche in assenza di una completa demolizione delle catene polimeriche. La

biodegradazione implica invece la frammentazione e l'assimilazione del polimero da parte dei microrganismi ed è generalmente limitata a particolari materiali e condizioni ambientali. Le fibre sintetiche possono quindi presentare discolorazioni, macchie, odori, formazione di patine biologiche e modificazioni superficiali anche quando il polimero principale rimane sostanzialmente integro (Szostak-Kotowa, 2004).

Tra i generi fungini frequentemente associati alla colonizzazione dei materiali sintetici figurano *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Chaetomium*, *Trichoderma* e *Stachybotrys* (Szostak-Kotowa, 2004). Alcune specie producono esterasi, proteasi ed enzimi ossidativi capaci di interagire con gruppi funzionali presenti nei poliesteri e nei poliuretani, provocando erosioni e modificazioni localizzate della superficie. I funghi ligninolitici possiedono inoltre sistemi enzimatici extracellulari poco specifici, comprendenti laccasi e perossidasi, capaci di trasformare coloranti e altri composti aromatici associati ai materiali tessili, pur senza determinare necessariamente una completa degradazione della fibra sintetica (Harper & Moody, 2023).

La suscettibilità delle fibre sintetiche può aumentare in seguito a processi preliminari di invecchiamento ambientale. L'esposizione a radiazioni ultraviolette, ossigeno, umidità e variazioni termiche può determinare foto-ossidazione, formazione di gruppi polari e incremento della rugosità superficiale, rendendo il materiale maggiormente bagnabile e favorendo l'adesione microbica. In particolare, il polipropilene, normalmente resistente al biodeterioramento, può diventare più accessibile ai microrganismi dopo l'alterazione indotta dalla radiazione ultravioletta, mentre nei poliesteri l'idrolisi risulta favorita nelle regioni amorfe o precedentemente danneggiate (Szostak-Kotowa, 2004).

Nell'ambito della biologia forense, le fibre sintetiche rivestono particolare interesse poiché sono frequentemente presenti in indumenti, rivestimenti, imbottiture e altri manufatti rinvenuti in ambienti domestici o associati a differenti contesti investigativi. Nel presente studio, il biodeterioramento fungino è stato analizzato su due materiali tessili costituiti da fibre sintetiche, provenienti da contesti ambientali differenti: un tessuto copridivano conservato in un ambiente di cantina e il tessuto di un ombrellone proveniente da Castiglione della Pescaia (GR), utilizzato in ambiente costiero. Nel primo caso, l'elevata umidità, la ridotta ventilazione e l'accumulo di polveri e residui organici possono favorire la crescita microbica e la colonizzazione superficiale del tessuto. L'ombrellone, invece, è stato sottoposto alle condizioni tipiche dell'ambiente marino e dell'esposizione esterna, tra cui salinità e umidità, oltre all'azione degli agenti atmosferici. L'analisi delle comunità fungine associate ai due reperti consente quindi di valutare come differenti condizioni di esposizione e conservazione possano influenzare la colonizzazione di materiali sintetici e contribuire alla comprensione dei processi post-deposizionali di potenziale interesse forense.

1.3 Confronto della degradazione fungina nei diversi materiali tessili

La suscettibilità dei materiali tessili al biodeterioramento fungino dipende principalmente dalla loro composizione chimica, dall'organizzazione strutturale delle fibre e dalle condizioni ambientali cui sono esposti. Sebbene cotone, cuoio e fibre sintetiche possano essere colonizzati da comunità fungine in parte sovrapponibili, i meccanismi degradativi e le alterazioni prodotte differiscono significativamente in funzione della natura del substrato. Il confronto tra questi materiali permette quindi di comprendere come le proprietà intrinseche del campione influenzino l'adesione delle spore, la penetrazione delle ife, l'attività enzimatica e la progressiva perdita dell'integrità strutturale.

Il cotone è un materiale di origine vegetale ed è costituito quasi esclusivamente da cellulosa, organizzata in regioni cristalline e amorfe. La degradazione è mediata prevalentemente dall'attività di enzimi cellulolitici, tra cui endoglucanasi, cellobioidrolasi e β -glucosidasi, che agiscono in maniera sinergica determinando la depolimerizzazione della cellulosa e la progressiva perdita della resistenza meccanica delle fibre (Angeles Flores et al., 2026; Szostak-Kotowa, 2004). Le regioni amorfe risultano generalmente più accessibili all'attacco enzimatico rispetto a quelle cristalline, rappresentando i siti iniziali della degradazione.

La modalità di penetrazione dei funghi nelle fibre di cotone rappresenta un ulteriore elemento distintivo. La degradazione può iniziare in corrispondenza delle estremità recise o di discontinuità della parete cellulare, attraverso le quali le spore raggiungono il lume della fibra. Dopo la germinazione, le ife si sviluppano all'interno della struttura e secernono enzimi cellulolitici che degradano progressivamente la parete dall'interno verso l'esterno (Szostak-Kotowa, 2004). La degradazione del cotone si manifesta generalmente con perdita di consistenza, erosione superficiale, microfratture, discolorazioni e progressiva riduzione della resistenza alla trazione, alterazioni che riflettono il progressivo deterioramento della matrice cellulosica causato dall'attività metabolica dei microrganismi fungini.

Nel cuoio il meccanismo degradativo è differente, poiché il principale componente strutturale è rappresentato dal collagene. La matrice proteica costituisce un substrato utilizzabile da funghi dotati di attività proteolitica, capaci di produrre proteasi e collagenasi extracellulari. Tali enzimi idrolizzano progressivamente le fibre di collagene, alterando la loro organizzazione tridimensionale e determinando perdita di elasticità, irrigidimento, fragilità e screpolature (Abdel-Maksoud et al., 2022a; Szostak-Kotowa, 2004).

Sebbene la concia aumenti la stabilità del materiale, non elimina completamente la suscettibilità al biodeterioramento. I fenomeni di invecchiamento, ossidazione e idrolisi possono infatti modificare la matrice di collagene e renderla maggiormente accessibile all'azione enzimatica. Rispetto alle fibre

cellulosiche, nel cuoio prevale quindi una degradazione proteolitica, alla quale possono contribuire anche grassi, oli e residui della lavorazione utilizzabili come fonti nutritive supplementari.

Le fibre sintetiche presentano invece una maggiore resistenza alla degradazione biologica diretta. I polimeri che le costituiscono sono generalmente caratterizzati da elevato peso molecolare, stabilità chimica, idrofobicità e presenza di regioni cristalline poco accessibili agli enzimi microbici. In questi materiali il biodeterioramento si manifesta soprattutto come colonizzazione superficiale, favorita dall'accumulo di polveri, sebo, cellule epiteliali, residui organici e additivi presenti sul manufatto.

La germinazione delle spore e la produzione di sostanze polimeriche extracellulari favoriscono la formazione di biofilm, che trattengono acqua e nutrienti e consentono la persistenza dei microrganismi anche in assenza di una reale assimilazione del polimero (Szostak-Kotowa, 2004). Solo alcuni materiali, come determinati poliuretani e poliesteri, possono essere interessati dall'attività di esterasi, proteasi ed enzimi ossidativi, soprattutto quando il polimero è stato precedentemente alterato da radiazioni ultraviolette, ossigeno, umidità o variazioni termiche.

Nonostante le differenze compositive, l'umidità rappresenta il principale fattore comune capace di favorire il biodeterioramento di tutti i materiali considerati. Nei substrati naturali, l'igroscopicità facilita l'assorbimento dell'acqua e la creazione di condizioni favorevoli alla germinazione delle spore e all'attività enzimatica. Nei materiali sintetici, pur essendo generalmente idrofobici, l'umidità può essere trattenuta dai contaminanti organici e dalla matrice del biofilm. Anche temperatura moderata, ventilazione insufficiente, accumulo di polveri e permanenza prolungata in ambienti confinati contribuiscono alla selezione delle comunità fungine e alla velocità dei processi degradativi (Angeles Flores et al., 2026; Gadd et al., 2024).

Le comunità fungine associate ai diversi materiali possono comprendere generi ubiquitari quali *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium* e *Alternaria*, ma la loro attività varia in funzione del substrato disponibile. Nei materiali cellulosici risultano particolarmente rilevanti anche generi caratterizzati da elevata attività cellulolitica, quali *Chaetomium*, *Trichoderma*, *Myrothecium* e *Stachybotrys*, mentre nel cuoio assumono maggiore importanza le specie dotate di attività proteolitica. Nei materiali sintetici, gli stessi generi possono colonizzare la superficie senza determinare necessariamente una degradazione significativa del polimero, sfruttando prevalentemente le sostanze organiche depositate sul manufatto.

Nel complesso, il confronto evidenzia una differente vulnerabilità dei substrati: il cotone risulta particolarmente suscettibile alla degradazione enzimatica delle componenti cellulosiche, il cuoio è principalmente interessato dall'idrolisi della matrice di collagene, mentre nelle fibre sintetiche predominano la colonizzazione superficiale e la formazione di biofilm. Tali differenze influenzano la

tipologia, l'intensità e la velocità delle alterazioni osservabili e devono essere considerate nell'interpretazione dello stato di conservazione dei campioni.

La valutazione congiunta della natura del materiale, delle comunità fungine presenti e delle condizioni ambientali costituisce pertanto un elemento essenziale per comprendere i processi post-deposizionali che interessano i manufatti tessili e per inquadrarne le possibili implicazioni in ambito forense.

1.4 Applicazioni forensi della degradazione fungina nei materiali tessili

Negli ultimi anni il biodeterioramento fungino ha assunto un ruolo di crescente interesse anche nell'ambito della biologia forense: se in passato la micologia forense trovava applicazione soprattutto nell'identificazione di specie tossiche o allucinogene coinvolte in episodi di avvelenamento, lo sviluppo delle conoscenze sull'ecologia fungina, sui processi post-deposizionali e sulle metodiche molecolari di identificazione ha progressivamente ampliato il campo di applicazione della disciplina. I funghi non vengono quindi considerati esclusivamente agenti responsabili dell'alterazione dei materiali, ma anche potenziali indicatori biologici e ambientali utili alla ricostruzione delle condizioni nelle quali un campione è stato conservato, esposto o rinvenuto (Hawksworth & Wiltshire, 2015, 2011; Karanth & Isukapatla, 2026a).

Tra i campioni di maggiore interesse investigativo rientrano gli indumenti e, più in generale, i materiali tessili, frequentemente presenti sulla scena del crimine o associati a resti umani. Essi costituiscono infatti un'interfaccia diretta tra il corpo e l'ambiente circostante e possono trattenere evidenze di natura biologica, chimica e particellare: sangue, saliva, liquido seminale, sudore, urine, cellule epiteliali, capelli, fibre estranee, residui di terreno, particelle vegetali e microrganismi possono depositarsi sul tessuto e conservarsi per intervalli di tempo variabili. La contemporanea presenza di tali elementi conferisce ai campioni tessili un rilevante valore probatorio, poiché consente di integrare informazioni relative al soggetto, all'ambiente di provenienza e agli eventi successivi alla deposizione.

La predisposizione dei tessuti alla colonizzazione fungina non dipende esclusivamente dalla natura della fibra, ma dall'interazione tra substrato, contaminazione organica e condizioni ambientali: le fibre naturali assorbono e trattengono più facilmente l'umidità, mentre pieghe, cuciture, colletti, polsini, tasche e spazi interfibrillari possono creare microambienti poco ventilati. Anche nei materiali sintetici, generalmente meno suscettibili alla degradazione diretta, l'accumulo di polveri, sebo, sudore, cellule epiteliali e residui biologici può favorire la crescita fungina sulla superficie.

I fluidi corporei assumono particolare rilievo perché apportano acqua e sostanze nutritive e possono quindi modificare localmente le modalità e l'intensità della proliferazione microbica. Di conseguenza,

due porzioni dello stesso indumento possono presentare livelli di alterazione molto differenti in funzione della distribuzione delle tracce biologiche e delle condizioni microambientali.

Dal punto di vista forense, la presenza e l'estensione del biodeterioramento possono contribuire innanzitutto alla ricostruzione delle condizioni di conservazione del campione. La crescita fungina è fortemente influenzata dall'umidità relativa, dalla temperatura, dalla ventilazione, dalla disponibilità di ossigeno e dalla presenza di sostanza organica: ambienti umidi e scarsamente aerati, quali cantine, locali seminterrati, edifici abbandonati, ambienti interessati da infiltrazioni d'acqua o spazi confinati, risultano generalmente favorevoli alla proliferazione delle muffe.

Condizioni analoghe possono instaurarsi all'interno di contenitori impermeabili, in particolare buste di plastica, quando il materiale tessile viene chiuso ancora umido o presenta fluidi biologici capaci di aumentare la quantità di acqua disponibile. In questi casi, la crescita fungina può fornire informazioni sulla permanenza del campione in un ambiente confinato, sulla ventilazione ridotta e sull'eventuale esposizione prolungata a condizioni microclimatiche favorevoli (Hawksworth & Wiltshire, 2015).

L'interpretazione non deve tuttavia limitarsi alla semplice rilevazione della presenza di muffe dato che anche la distribuzione spaziale delle colonie può assumere un valore informativo particolarmente rilevante: la colonizzazione avviene raramente in modo uniforme, poiché umidità, ossigeno e nutrienti non sono distribuiti omogeneamente sull'intera superficie del tessuto. Le aree impregnate di sangue o di altri fluidi corporei, le pieghe, le cuciture e le porzioni a diretto contatto con il terreno o con superfici contaminate possono favorire uno sviluppo fungino più intenso rispetto alle zone asciutte e maggiormente ventilate.

Analogamente, la prevalenza della crescita sulla superficie interna o esterna di un indumento può suggerire differenti modalità di esposizione e conservazione. La documentazione della disposizione delle colonie può quindi contribuire alla ricostruzione della storia post-deposizionale del campione: una colonizzazione concentrata nelle pieghe può essere compatibile con una permanenza prolungata del tessuto ripiegato; una crescita più abbondante in corrispondenza del colletto, dei polsini o delle tasche può riflettere una maggiore presenza di sudore, sebo o cellule epiteliali; una distribuzione circoscritta alle zone a contatto con il suolo può invece suggerire il ruolo dell'umidità o dei microrganismi ambientali presenti sulla superficie di deposizione.

Tali elementi non permettono, considerati singolarmente, di ricostruire con certezza la dinamica degli eventi, ma possono assumere valore quando vengono interpretati insieme alla posizione del campione, alle caratteristiche del luogo di rinvenimento e alle altre evidenze disponibili.

Anche il grado di sviluppo fungino può fornire indicazioni sulla durata minima della permanenza del materiale in condizioni favorevoli: il confronto tra colonie cresciute in situ e colture ottenute sperimentalmente in condizioni ambientali analoghe è stato proposto come possibile approccio per

stimare un'età minima della colonizzazione (Hawksworth & Wiltshire, 2015). L'applicazione ai materiali tessili richiede tuttavia particolare prudenza, perché la velocità di crescita dipende dalla specie fungina, dalla composizione della fibra, dalla presenza di fluidi biologici, dall'umidità, dalla temperatura e dalla ventilazione.

Il grado di alterazione non può pertanto essere utilizzato come indicatore diretto del tempo trascorso dalla deposizione né dell'intervallo post-mortale. Può però contribuire a stabilire che il campione sia rimasto per un intervallo non trascurabile in condizioni compatibili con la germinazione e lo sviluppo fungino.

Un ulteriore aspetto di interesse riguarda gli effetti del biodeterioramento sulla conservazione delle tracce biologiche: sangue, saliva, liquido seminale, urine e cellule epiteliali rappresentano importanti fonti di DNA umano, ma costituiscono anche substrati utilizzabili dai microrganismi. La crescita fungina può modificare l'aspetto macroscopico delle macchie, ricoprirne parzialmente la superficie, alterarne i margini e renderne più complessa la localizzazione. L'espansione delle colonie può inoltre produrre discolorazioni che si sovrappongono alle tracce originarie, interferendo con la loro osservazione e con l'interpretazione della forma e dell'estensione della macchia.

La proliferazione fungina può influenzare anche le successive analisi biologiche e genetiche: la degradazione delle cellule e delle biomolecole presenti sul tessuto può ridurre la quantità e la qualità del DNA umano recuperabile. La biomassa fungina introduce inoltre DNA non umano e composti potenzialmente capaci di interferire con le procedure di estrazione o amplificazione. Un campione apparentemente abbondante può quindi fornire un profilo genetico parziale o non interpretabile quando la traccia biologica è stata sottoposta a prolungata attività microbica. Sebbene gli effetti dipendano dal tipo di fluido, dal substrato e dalle condizioni ambientali, lo stato micologico del campione dovrebbe essere documentato prima del campionamento, così da considerare il biodeterioramento tra i possibili fattori responsabili di una ridotta resa analitica (Karanth & Isukapata, 2026a).

La presenza di funghi sui materiali tessili può assumere valore anche come traccia ambientale. La composizione della comunità fungina deriva dall'interazione tra caratteristiche del substrato, microclima e ambiente di esposizione. Un tessuto conservato in cantina, un indumento chiuso in una busta di plastica e un manufatto rimasto all'aperto possono quindi selezionare comunità differenti. Il confronto tra i taxa rinvenuti sul campione e quelli presenti nell'ambiente può contribuire a valutare la compatibilità tra il materiale e un determinato luogo di conservazione o rinvenimento.

In prospettiva, l'insieme dei funghi associati al campione potrebbe rappresentare una sorta di impronta ecologica, da utilizzare insieme ai dati botanici, palinologici, microbiologici e merceologici. Tale approccio richiede però cautela interpretativa: le spore fungine sono ubiquitarie e possono

depositarsi accidentalmente mediante aria, acqua, contatto con superfici contaminate o manipolazione. La semplice rilevazione di propaguli non dimostra quindi che il fungo abbia effettivamente colonizzato il tessuto né che derivi dal luogo di rinvenimento.

Per attribuire maggiore significato all'evidenza è necessario verificare la presenza di crescita attiva, micelio aderente, strutture riproduttive o alterazioni localizzate del materiale. Anche la coerenza tra distribuzione delle colonie, microambiente e natura del substrato deve essere valutata prima di formulare ipotesi sulla provenienza o sulla storia conservativa del campione.

Le procedure di campionamento rappresentano un ulteriore punto critico. Prima della manipolazione è opportuno documentare fotograficamente l'intera superficie, la localizzazione delle colonie, le aree interessate da fluidi biologici, le pieghe e le zone di contatto con il contenitore o con l'ambiente. Il campionamento dovrebbe comprendere più aree dello stesso manufatto, includendo porzioni colonizzate, zone apparentemente indenni e, quando possibile, campioni di controllo ambientale. Tale strategia consente di valutare l'eterogeneità spaziale della crescita e riduce il rischio di descrivere l'intero campione sulla base di un'unica porzione.

L'isolamento culturale permette di ottenere ceppi vitali e di descriverne le caratteristiche morfologiche, ma può fornire una rappresentazione incompleta della comunità originaria. I terreni e le condizioni di incubazione selezionano infatti le specie più adatte alla crescita in laboratorio, mentre taxa lenti, poco competitivi o non coltivabili possono non essere rilevati. Per tale motivo, l'identificazione morfologica e culturale dovrebbe essere integrata, quando possibile, con approcci molecolari.

Il sequenziamento ad alta processività e il metabarcoding consentono di rilevare simultaneamente numerosi taxa, inclusi quelli non coltivabili, offrendo una descrizione più ampia della biodiversità associata al campione. Rimangono tuttavia necessari protocolli standardizzati, controlli di contaminazione, database più completi e criteri interpretativi specificamente validati per l'ambito forense (Karanth & Isukapatta, 2026a).

Alla luce delle conoscenze disponibili, il biodeterioramento fungino dei materiali tessili rappresenta un settore ancora poco esplorato rispetto agli studi sulla decomposizione cadaverica, sulle comunità del suolo e sulla micologia degli ambienti indoor. Sono ancora limitate le ricerche dedicate alle differenze tra fibre naturali, cuoio e materiali sintetici, alla distribuzione spaziale delle colonie sui campioni e agli effetti della crescita fungina sulla conservazione di sangue, saliva, cellule epiteliali e DNA. Risulta quindi necessario sviluppare studi sperimentali nei quali composizione del materiale, condizioni ambientali, durata dell'esposizione e presenza di fluidi biologici siano controllate e documentate.

In tale contesto si inserisce il presente lavoro, finalizzato allo studio della colonizzazione fungina di materiali caratterizzati da differente composizione e potenziale interesse forense. La cintura di cuoio è stata utilizzata per valutare la colonizzazione di un substrato organico prevalentemente proteico; il tessuto da copridivano proveniente da una cantina ha permesso di osservare un materiale sintetico esposto a un ambiente indoor potenzialmente umido e poco ventilato; il tessuto da ombrellone, costituito da fibre sintetiche, ha rappresentato un ulteriore substrato polimerico esposto agli agenti atmosferici, consentendo di valutare l'influenza dell'esposizione ambientale sullo sviluppo delle comunità fungine. Particolare attenzione è stata dedicata alla camicia di cotone, inizialmente inserita in una busta di plastica e sotterrata, successivamente dissotterrata e infine conservata all'interno della stessa busta di plastica, scelta per riprodurre un microambiente confinato caratterizzato da elevata umidità e ridotta ventilazione. Il campionamento differenziato del colletto, del tessuto della camicia e della superficie interna della busta ha consentito di valutare la distribuzione spaziale della contaminazione e di confrontare aree caratterizzate da differenti condizioni di contatto, accumulo di umidità e disponibilità di residui organici. Tale impostazione risponde a una domanda direttamente forense: comprendere come la permanenza di un indumento all'interno di un contenitore impermeabile possa influenzare la colonizzazione fungina e lo stato di conservazione del campione. Il confronto tra i diversi materiali consente inoltre di valutare se substrati caratterizzati da differente composizione chimica possano selezionare comunità fungine differenti o presentare specifiche modalità di biodeterioramento. Il presente lavoro non ha lo scopo di definire modelli cronologici per la stima del tempo di permanenza del campione o dell'intervallo post-mortale, ma intende fornire dati preliminari sulle relazioni tra natura del materiale, microambiente e sviluppo fungino. L'integrazione delle osservazioni micologiche con le informazioni relative alla localizzazione delle colonie, alle modalità di conservazione e al contesto di provenienza può rappresentare un primo passo verso protocolli interpretativi utili alla biologia forense e alla ricostruzione della storia post-deposizionale dei campioni tessili.

2. SCOPO DELLA TESI

La colonizzazione fungina e il relativo biodeterioramento dei materiali tessili sono processi ancora poco studiati in ambito forense, nonostante gli indumenti e vari altri materiali tessili costituiscano campioni frequentemente rinvenuti sulla scena del crimine o in associazione a resti umani. Durante la permanenza nell'ambiente, tali materiali sono sottoposti all'azione combinata dei fattori ambientali, dei processi biologici e della colonizzazione microbica. La crescita fungina può quindi contribuire non soltanto al deterioramento del substrato, ma anche riflettere le condizioni microambientali alle quali il campione è stato esposto.

Alla luce di queste considerazioni, il presente lavoro si propone di studiare la colonizzazione e il biodeterioramento fungino di quattro materiali caratterizzati da diversa composizione e differenti storie ambientali: una camicia di cotone, una cintura di cuoio, un tessuto sintetico appartenente a un copridivano e un tessuto sintetico proveniente da un ombrellone.

Gli obiettivi specifici dello studio sono:

- caratterizzare la componente fungina coltivabile associata ai differenti campioni mediante isolamento, osservazione macro- e micro-morfologica e identificazione molecolare;
- valutare l'influenza della natura del substrato e delle condizioni microambientali sulla distribuzione dei taxa fungini recuperati;
- descrivere la diversità degli isolati fungini attraverso la ricchezza tassonomica osservata e gli indici di Shannon e Simpson, utilizzati con finalità descrittiva ed esplorativa;
- valutare la relazione tra natura del substrato, condizioni microambientali e distribuzione dei taxa fungini recuperati;
- esplorare il potenziale contributo della caratterizzazione micologica all'analisi forense dei materiali tessili, considerando il profilo degli isolati fungini e le evidenze di colonizzazione come informazioni biologiche complementari potenzialmente utili alla ricostruzione delle condizioni di esposizione, conservazione e trasformazione post-deposizionale del campione.

Il lavoro non mira quindi a definire un indicatore forense autonomo, ma a valutare in che modo la caratterizzazione micologica possa integrare le informazioni relative al materiale, al microambiente e alla storia conservativa del campione.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Campioni e Campionamento

I materiali oggetto del presente studio sono stati selezionati in funzione della loro differente composizione chimica, delle diverse condizioni di esposizione ambientale e del potenziale interesse in ambito forense, con l'obiettivo di valutare la colonizzazione fungina naturale e le alterazioni associate ai processi di biodeterioramento. Sono stati analizzati campioni costituiti da matrici di natura proteica, cellulosica e sintetica, caratterizzati da differenti modalità di conservazione e da specifici microambienti di esposizione, al fine di confrontare il comportamento di substrati con proprietà chimico-fisiche differenti nei confronti della crescita fungina.

I campioni analizzati comprendono una cintura in cuoio, una camicia di cotone, un tessuto di rivestimento sintetico (copridivano) e un tessuto sintetico appartenente a un ombrellone. La cintura in cuoio è stata acquistata nuova e successivamente conservata per circa un anno all'interno di un'abitazione privata situata a Genova. Durante tale periodo il campione è rimasto appeso all'interno di un armadio, in normali condizioni domestiche, con temperature variabili in funzione della stagionalità, comprese mediamente tra 18 ± 1 °C nel periodo invernale e valori generalmente non superiori a 32 °C durante il periodo estivo.

Il tessuto di rivestimento sintetico (copridivano) proveniva da una cantina privata caratterizzata da elevata umidità relativa, scarsa ventilazione, assenza di illuminazione naturale e limitata escursione termica, condizioni ambientali favorevoli allo sviluppo di microrganismi fungini e alla formazione di biofilm superficiali. Tale materiale è stato selezionato quale modello di substrato sintetico esposto per un lungo periodo a un microambiente indoor favorevole al biodeterioramento biologico.

Il tessuto dell'ombrellone, costituito da fibre sintetiche, proveniva da Castiglione della Pescaia (Provincia di Grosseto) ed era stato utilizzato in ambiente costiero. Durante il normale impiego il materiale è risultato esposto ai principali fattori caratteristici dell'ambiente marino, quali radiazione solare, aerosol salino, elevata umidità, precipitazioni, vento e variazioni termiche stagionali. L'azione combinata di tali fattori può determinare fenomeni di invecchiamento del materiale e modificazioni delle caratteristiche superficiali, influenzando i processi di adesione e sviluppo delle comunità fungine.

La camicia di cotone rappresenta il campione sperimentale di maggiore interesse del presente studio: il materiale è stato inserito all'interno di una busta di plastica e interrato presso l'Orto Botanico dell'Università di Genova, nell'area adiacente all'Albergo dei Poveri, dove è rimasto esposto alle condizioni pedologiche naturali per il periodo di circa un anno. Al termine dell'interramento il campione è stato dissotterrato e conservato all'interno della stessa busta di plastica sigillata, allo

scopo di riprodurre un microambiente confinato caratterizzato da elevata umidità e ridotta ventilazione.

Prima dell'avvio delle analisi microbiologiche tutti i campioni sono stati sottoposti a documentazione fotografica macroscopica, eseguita al termine del periodo di esposizione ambientale, al fine di documentarne lo stato di conservazione e le alterazioni superficiali osservabili prima delle procedure di campionamento (**Figura 1**). Le immagini sono state acquisite mediante dispositivo fotografico digitale in condizioni di illuminazione controllata. Per la camicia di cotone sono state realizzate fotografie dell'intero campione all'interno della busta di plastica, oltre a immagini di dettaglio del colletto e dei frammenti di tessuto successivamente destinati ai campionamenti microbiologici. Per la cintura in cuoio sono state acquisite immagini macroscopiche dell'intero manufatto dopo il periodo di esposizione domestica, mentre per il tessuto copridivano sono state documentate le alterazioni macroscopiche osservabili al termine della permanenza nell'ambiente di cantina. Per il tessuto dell'ombrellone non è stata acquisita documentazione fotografica.



Figura 1. Documentazione fotografica macroscopica dei campioni oggetto di studio prima del campionamento microbiologico. **A)** Camicia di cotone. **B)** Brandelli distaccati della camicia di cotone. **C)** Superficie interna della busta di plastica contenente la camicia. **D)** Colletto della camicia di cotone. **E)** Tessuto di rivestimento sintetico (copridivano). **F)** Cintura in cuoio.

La caratterizzazione morfologica dei materiali è stata ulteriormente approfondita mediante osservazione allo stereomicroscopio della cintura in cuoio e del tessuto copridivano (**Figura 2**), con l'obiettivo di evidenziare la morfologia superficiale, la disposizione delle fibre e le principali alterazioni riconducibili ai processi di biodeterioramento. Per la camicia di cotone e per il tessuto dell'ombrellone non sono invece disponibili immagini acquisite allo stereomicroscopio.

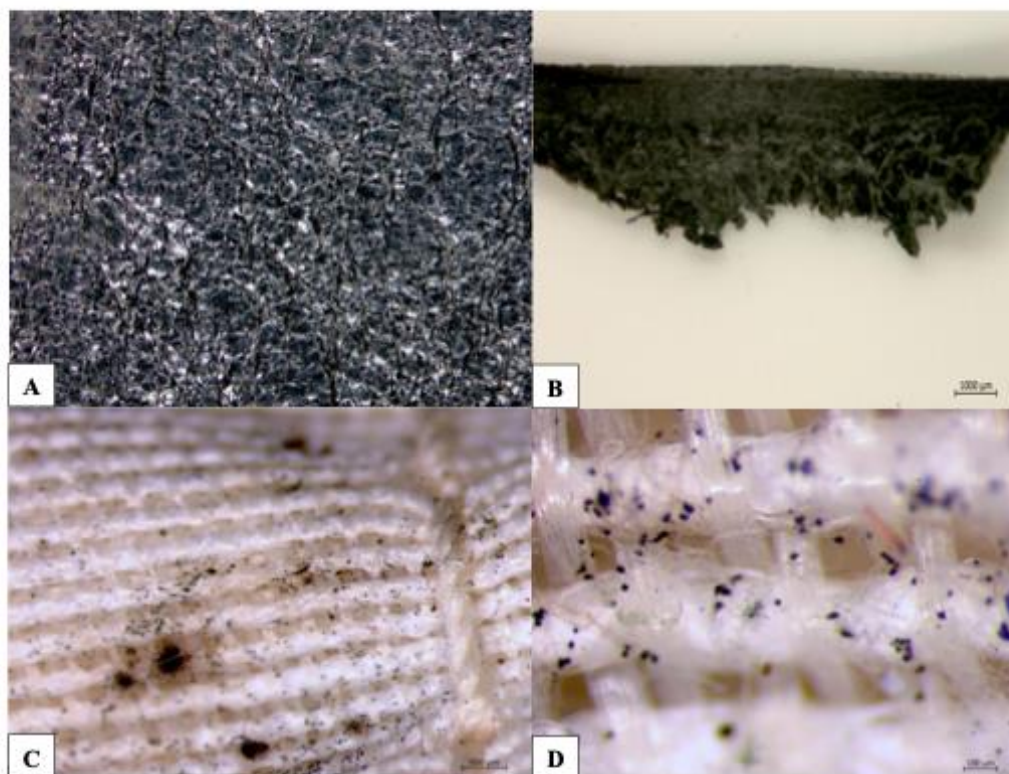


Figura 2. Immagini acquisite allo stereomicroscopio della cintura in cuoio e del tessuto di rivestimento sintetico (copridivano). **A)** Superficie della cintura in cuoio. **B)** Sezione trasversale della cintura in cuoio. **C)** Superficie del tessuto di rivestimento sintetico con colonie fungine. **D)** Dettaglio delle fibre sintetiche con colonie fungine.

Le modalità e il numero dei prelievi sono stati definiti in funzione delle caratteristiche morfologiche, delle dimensioni, della conformazione e dell'estensione della superficie disponibile per ciascun campione. Il numero dei punti di prelievo non è stato quindi uniforme tra i diversi materiali, ma è stato adattato alle caratteristiche specifiche di ciascun campione.

La camicia di cotone, caratterizzata dalla maggiore estensione superficiale e dalla presenza di aree strutturalmente differenti, è stata sottoposta al campionamento più articolato. Sono stati analizzati cinque differenti punti di prelievo, dai quali sono stati complessivamente ottenuti 14 isolati fungini. I campionamenti hanno interessato il colletto, la parte anteriore e la parte posteriore del corpo della camicia, i brandelli distaccati del tessuto e la superficie interna della busta di plastica contenente il campione. I prelievi sono stati effettuati mediante tamponi sterili (swab) e, nel caso dei frammenti distaccati, mediante campionamento diretto del materiale tessile. La maggiore articolazione del campionamento è stata resa possibile dall'ampia superficie della camicia e dall'eterogeneità delle diverse porzioni del manufatto, consentendo inoltre di valutare la distribuzione spaziale della colonizzazione fungina nelle differenti aree analizzate.

La cintura di cuoio presentava invece un'area superficiale inferiore rispetto alla camicia e una conformazione differente. Il campione è stato pertanto sottoposto a due prelievi, dai quali sono stati

ottenuti complessivamente quattro isolati fungini. Il campionamento ha interessato la parte esterna e la parte interna della cintura; il manufatto è stato inoltre sezionato per consentire l'accesso alla porzione interna del materiale. Tale modalità ha permesso di considerare le superfici caratterizzate da una differente esposizione all'ambiente. Il minor numero di prelievi rispetto alla camicia è pertanto riconducibile principalmente alla minore estensione della superficie disponibile e alla diversa conformazione del campione.

Per il tessuto sintetico del copridivano, conservato all'interno di una busta di plastica, è stato adottato un campionamento selettivo mediante tamponi sterili e aghi sterili. I prelievi sono stati effettuati sulle porzioni macroscopicamente più scure del tessuto, selezionate in quanto caratterizzate dalle alterazioni superficiali maggiormente evidenti. In questo caso, il campionamento non era quindi finalizzato a rappresentare uniformemente l'intera superficie del campione, ma a caratterizzare le aree macroscopicamente alterate considerate di maggiore interesse per l'isolamento dei microrganismi fungini.

Il tessuto sintetico dell'ombrellone è stato invece campionato separatamente sulla superficie interna e su quella esterna, in considerazione della differente esposizione delle due facce alle condizioni ambientali. La superficie esterna risultava direttamente esposta agli agenti atmosferici e all'ambiente costiero, mentre quella interna presentava condizioni di esposizione differenti. Il campionamento separato delle due superfici ha pertanto consentito di considerare l'eterogeneità ambientale presente all'interno dello stesso campione.

Le differenze di estensione superficiale, conformazione ed eterogeneità dei quattro campioni hanno quindi determinato un diverso numero di punti di prelievo e, conseguentemente, un diverso numero di isolati ottenuti. Tale aspetto deve essere considerato nell'interpretazione dei risultati, poiché il numero assoluto di isolati recuperati dai singoli materiali non rappresenta una misura direttamente confrontabile della relativa ricchezza fungina. In particolare, la maggiore superficie della camicia e il conseguente maggior numero di punti di prelievo hanno determinato una maggiore probabilità di intercettare taxa differenti rispetto a campioni caratterizzati da un'area più limitata e sottoposti a un numero inferiore di prelievi, come la cintura.

I confronti tra i materiali sono stati pertanto interpretati tenendo conto delle differenze nel numero e nella distribuzione dei punti di prelievo tra i campioni, considerando principalmente la composizione tassonomica e la distribuzione dei taxa nelle diverse aree analizzate.

I campioni ottenuti sono stati successivamente sottoposti alle procedure di isolamento colturale, caratterizzazione morfologica e identificazione molecolare descritte nei paragrafi successivi. Il disegno sperimentale complessivo, dal campionamento dei campioni fino all'identificazione molecolare e alla successiva interpretazione dei risultati, è riportato nel **Diagramma di flusso I**.

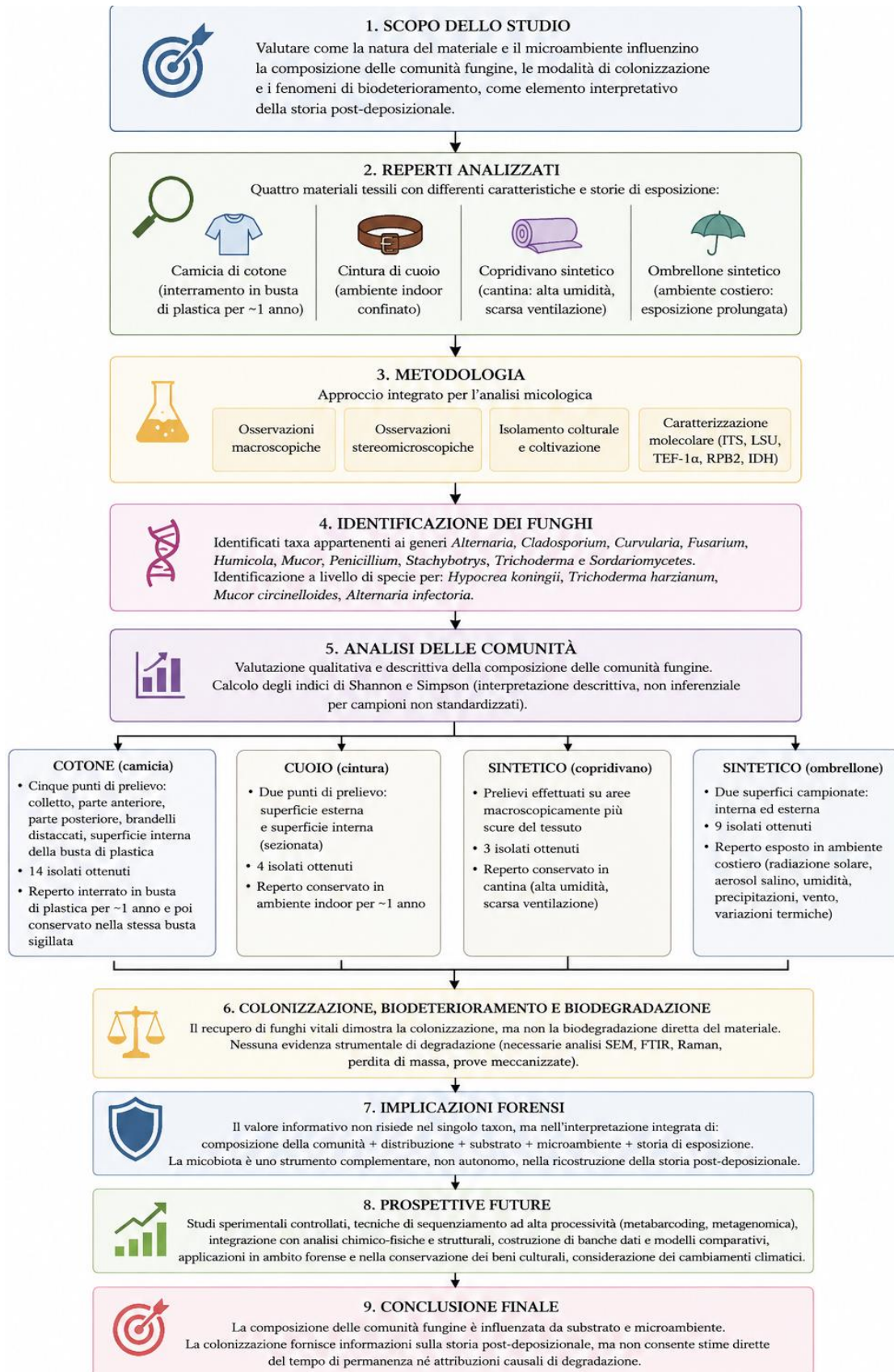


Diagramma di flusso I. Disegno sperimentale eseguito durante il presente studio

3.2 Terreni di coltura e preparazione

Per l'isolamento dei microrganismi fungini sono stati impiegati differenti terreni di coltura, selezionati in funzione delle loro caratteristiche nutrizionali e della diversa capacità di favorire la crescita di specie fungine ambientali. L'impiego combinato di substrati selettivi e non selettivi ha consentito di aumentare il recupero della biodiversità fungina presente nei campioni, favorendo la crescita di microrganismi con differenti esigenze nutrizionali e limitando, ove necessario, la proliferazione della componente batterica.

Nel presente studio sono stati utilizzati Malt Extract Agar (MEA), Malt Extract Agar supplementato con antibiotici (MEAC, MEAS e MEAP), Sabouraud Dextrose Agar (SAB), Potato Dextrose Agar (PDA), Malt Liver Agar (MLA), BLA e Rosa Bengala Agar (RB). Ciascun terreno è stato impiegato in funzione delle proprie caratteristiche nutrizionali e selettive, così da ottenere una crescita quanto più rappresentativa possibile delle comunità fungine associate ai diversi campioni.

Tra i terreni utilizzati, il Malt Extract Agar (MEA) rappresenta uno dei substrati maggiormente impiegati nella micologia ambientale grazie alla presenza di estratto di malto, glucosio e peptone, che costituiscono fonti di carbonio e azoto facilmente assimilabili dalla maggior parte dei funghi filamentosi. Per ridurre la crescita batterica nei campioni maggiormente contaminati sono state inoltre utilizzate tre varianti del terreno, indicate come MEAC, MEAS e MEAP, ottenute mediante supplementazione rispettivamente con cloramfenicolo, streptomicina e penicillina. L'impiego di antibiotici nei terreni di coltura rappresenta una pratica consolidata nella microbiologia ambientale, poiché consente di limitare la proliferazione batterica senza interferire significativamente con lo sviluppo della maggior parte dei funghi filamentosi, migliorando l'isolamento delle colonie e facilitandone la successiva caratterizzazione morfologica.

Il Potato Dextrose Agar (PDA) è stato utilizzato quale terreno nutritivo ad elevato contenuto di carboidrati, particolarmente indicato per favorire lo sviluppo vegetativo, la sporulazione e la pigmentazione di numerose specie fungine. Il Sabouraud Dextrose Agar (SAB) è stato invece impiegato quale terreno di routine per l'isolamento di funghi filamentosi e lieviti, grazie al pH leggermente acido e all'elevata concentrazione di destrosio, che limitano parzialmente la crescita di numerosi batteri contaminanti.

Il Malt Liver Agar (MLA) e il BLA sono stati utilizzati come terreni nutritivi arricchiti, in grado di favorire lo sviluppo di specie fungine caratterizzate da maggiori esigenze nutrizionali e di migliorare la differenziazione macroscopica delle colonie. Il Rosa Bengala Agar (RB), contenente rosa bengala, dicloran e cloramfenicolo, è stato impiegato come terreno selettivo per l'isolamento di funghi da matrici ambientali, limitando l'espansione delle colonie a crescita rapida.

Nell'ambito delle attività sperimentali svolte durante il tirocinio sono stati preparati direttamente il Malt Extract Agar (MEA), le relative varianti supplementate con antibiotici (MEAC, MEAS e MEAP) e il Rosa Bengala Agar (RB), mentre i restanti terreni di coltura sono stati utilizzati secondo i protocolli routinariamente adottati presso il laboratorio.

Il terreno MEA è stato preparato utilizzando reagenti di grado microbiologico costituiti da D-(+)-Glucose (Sigma-Aldrich), Malt Extract for Microbiology (Millipore), Mycological Peptone (Sigma-Aldrich) e Bacteriological Agar (Thermo Scientific) (**Figura 3**).



Figura 3. Reagenti di grado microbiologico utilizzati per la preparazione del terreno di coltura Malt Extract Agar (MEA). **A)** Agar batteriologico. **B)** Estratto di malto. **C)** D-(+)-glucosio. **D)** Peptone micologico.

Per la preparazione di 500 mL di terreno sono stati pesati 10 g di estratto di malto, 10 g di glucosio, 10 g di agar e 0,5 g di peptone, secondo la formulazione standard del terreno. Le pesate sono state effettuate mediante bilancia analitica Sartorius Handy, previa tara dello strumento. I componenti sono stati successivamente sospesi in acqua distillata fino al raggiungimento del volume finale e sottoposti a riscaldamento con agitazione fino alla completa dissoluzione. Il terreno è stato trasferito in contenitori di vetro idonei alla sterilizzazione, chiusi con tappo leggermente allentato e protetti mediante foglio di alluminio. La sterilizzazione è stata effettuata mediante autoclave da banco S.M.E.G. modello AVS23, utilizzando un ciclo a 121°C per 15 minuti (fast discharge), con pressione di esercizio pari a circa 1,1-1,2 bar. Al termine del ciclo il terreno è stato lasciato raffreddare fino a una temperatura di circa 45-50°C. Per la preparazione delle varianti MEAC, MEAS e MEAP, al terreno ormai raffreddato sono state aggiunte, sotto cappa a flusso laminare, soluzioni sterili degli antibiotici precedentemente preparate e sterilizzate mediante filtrazione. In particolare, il cloramfenicolo è stato impiegato come antibiotico ad ampio spettro nei confronti di numerosi batteri Gram-positivi e Gram-negativi, la streptomina per ampliare l'attività antibatterica soprattutto verso batteri ambientali Gram-negativi, mentre la penicillina è stata utilizzata principalmente per limitare

la crescita dei batteri Gram-positivi. Dopo accurata omogeneizzazione, i terreni sono stati colati in piastre Petri sterili da 90×15 mm, distribuendo circa 16 mL di terreno per piastra. Da 500 mL di terreno sono state ottenute mediamente 30 piastre, lasciate solidificare a temperatura ambiente, etichettate e conservate fino all'utilizzo.

Il terreno Rosa Bengala Agar (RB) è stato preparato utilizzando un preparato commerciale disidratato Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (VWR Chemicals, BDH) (**Figura 4**).



Figura 4. Preparato commerciale Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC Agar; VWR Chemicals, BDH Chemicals) utilizzato per la preparazione del terreno Rosa Bengala Agar (RB).

Per un volume finale di 500 mL sono stati pesati 15,8 g di terreno disidratato, corrispondenti alla concentrazione indicata dal produttore (31,6 g/L). La polvere è stata sospesa in acqua distillata, riscaldata fino a completa dissoluzione e successivamente sterilizzata nelle medesime condizioni utilizzate per il terreno MEA. Dopo il raffreddamento a circa $45-50^{\circ}\text{C}$, il terreno è stato colato sotto cappa a flusso laminare in piastre Petri sterili da 90×15 mm, ottenendo circa 30 piastre da 16 mL ciascuna. Le piastre sono state lasciate solidificare, etichettate e conservate fino al momento dell'impiego.

L'aspetto dei terreni preparati e delle relative piastre è riportato in **Figura 5**.

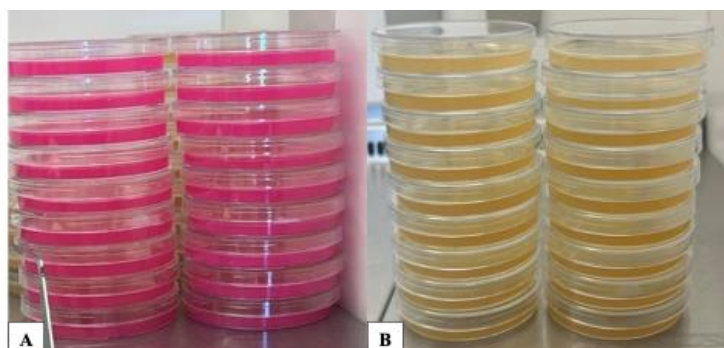


Figura 5. Terreni di coltura fungini preparati e colati in piastre Petri sterili. **A)** Rosa Bengala Agar (RB). **B)** Malt Extract Agar (MEA).

3.3 Campionamento e preparazione delle piastre madri

Il campionamento dei materiali tessili è stato eseguito in condizioni di sterilità operando sotto cappa a flusso laminare, preventivamente sanificata mediante disinfezione della superficie di lavoro con etanolo al 70% e successiva esposizione a radiazione ultravioletta (UV). Tutti gli strumenti impiegati durante le operazioni di campionamento (pinze, forbici e aghi microbiologici) sono stati preventivamente sterilizzati al fine di ridurre il rischio di contaminazioni crociate.

Le modalità di campionamento sono state adattate alle caratteristiche dei diversi campioni. Per la camicia di cotone, il campionamento è stato effettuato mediante tamponi sterili (swab) prelevando il materiale biologico dalla superficie anteriore, dalla superficie posteriore, dal colletto e dalla superficie interna della busta di plastica nella quale il campione era stato conservato dopo il disseppellimento. Contestualmente sono stati raccolti piccoli brandelli di tessuto provenienti dalle aree maggiormente deteriorate, destinati alle successive analisi microbiologiche e molecolari.

Per la cintura in cuoio e per il tessuto dell'ombrellone il campionamento è stato effettuato esclusivamente mediante swab sterile, strofinato sulla superficie del materiale al fine di recuperare la componente microbica aderente.

Per il tessuto di rivestimento sintetico (copridivano) sono state impiegate due differenti modalità di campionamento. Oltre al prelievo mediante swab sterile, parte del materiale biologico presente sulla superficie del campione è stata trasferita direttamente sui terreni di coltura mediante tecnica dello striscio, allo scopo di confrontare l'efficacia delle due metodiche nell'isolamento dei microrganismi fungini.

Il materiale campionato è stato inoculato su differenti terreni di coltura solidi, comprendenti Malt Extract Agar (MEA), Malt Liver Agar (MLA), Blood Liver Agar (BLA), Potato Dextrose Agar (PDA), Sabouraud Dextrose Agar (SAB) e Rose Bengal Agar (RB), selezionati per favorire l'isolamento di un'ampia varietà di microrganismi fungini e, nel caso dei terreni supplementati con antibiotici, limitare la crescita della componente batterica contaminante. L'inoculo è stato effettuato direttamente sulla superficie dei terreni agarizzati. Nel caso dei campioni prelevati mediante swab, il tampone sterile è stato strofinato direttamente sulla superficie del terreno con movimenti rotatori e progressivi, favorendo il trasferimento del materiale microbiologico (**Figura 6A**). Per il tessuto copridivano, il materiale biologico è stato inoltre distribuito mediante tecnica dello striscio, al fine di ottenere una maggiore dispersione dell'inoculo sulla superficie del terreno. Ogni piastra è stata successivamente identificata riportando il codice del campione, il terreno di coltura utilizzato e la data di inoculo (**Figura 6B**).

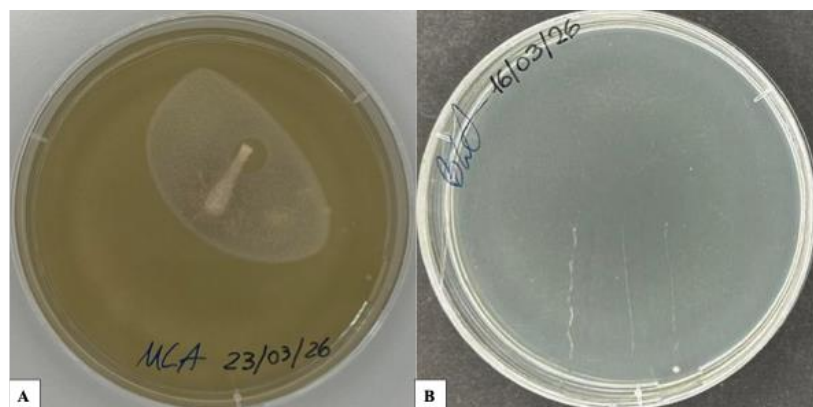


Figura 6. Procedure di inoculo adottate per l'isolamento dei microrganismi fungini. **A)** Tampone (swab); **B)** Tecnica dello striscio

Parallelamente sono state preparate piastre madri mediante sospensione del materiale biologico in acqua sterile. Una porzione del campione è stata trasferita in circa 50 mL di acqua sterile e sottoposta ad agitazione mediante vortex per circa 1 minuto, allo scopo di favorire il distacco dei microrganismi aderenti alle fibre tessili e ottenere una sospensione omogenea. Successivamente, un'aliquota di circa 0,5 mL della sospensione è stata inoculata mediante tecnica dello striscio su terreni MEA e RB, favorendo una distribuzione uniforme dell'inoculo e l'isolamento delle colonie fungine. Le piastre inoculate sono state incubate a temperatura ambiente controllata (24 ± 1 °C) e monitorate periodicamente, generalmente ogni 48 ore, per valutare la comparsa e l'evoluzione delle colonie fungine. Durante l'incubazione sono state registrate le principali caratteristiche macroscopiche delle colonie, quali velocità di crescita, morfologia, margine, consistenza, colore dell'anverso e del verso ed eventuale produzione di pigmenti diffusibili nel terreno di coltura. Le colonie morfologicamente differenti sono state successivamente selezionate e sottoposte a subcoltura su nuovi terreni, al fine di ottenere colture pure destinate alle successive analisi microscopiche e molecolari.

3.4 Isolamento in coltura pura

L'isolamento in coltura pura è stato eseguito con l'obiettivo di ottenere colonie fungine costituite da un unico microrganismo, eliminando la presenza di specie differenti eventualmente sviluppatesi sulla stessa piastra primaria. Tale procedura ha rappresentato un passaggio fondamentale del protocollo sperimentale, poiché ha consentito di disporre di isolati idonei alle successive caratterizzazioni macroscopiche, microscopiche e molecolari.

Le piastre inoculate sono state controllate periodicamente durante l'incubazione, generalmente ogni 48 ore, valutando la comparsa e lo sviluppo delle colonie fungine. Per ciascuna colonia sono state osservate e registrate le principali caratteristiche macroscopiche, comprendenti velocità di crescita, colore dell'anverso e del verso, morfologia, consistenza, margine della colonia ed eventuale

produzione di pigmenti diffusibili nel terreno di coltura. L'insieme di questi caratteri ha consentito di distinguere i diversi morfotipi presenti sui campioni e di selezionare le colonie ritenute rappresentative della biodiversità fungina osservata.

Tutte le operazioni di reisolamento sono state effettuate in condizioni di sterilità sotto cappa a flusso laminare, previamente sanificata, utilizzando aghi microbiologici e pinze sterili. Una piccola porzione di micelio, oppure di materiale sporale, è stata prelevata dalla porzione periferica della colonia, corrispondente all'area di crescita più attiva, e trasferita su nuove piastre di coltura contenenti Malt Extract Agar (MEA), Potato Dextrose Agar (PDA), Malt Extract Agar supplementato con antibiotici (MEAC, MEAS e MEAP) e Rose Bengal Agar (RB). La scelta del terreno è stata effettuata in funzione delle caratteristiche della colonia e delle successive esigenze sperimentali. Il trasferimento del materiale biologico è stato eseguito mediante tecnica dei tre punti (**Figura 7**). La procedura consiste nel depositare tre piccoli inoculi sulla superficie del terreno agarizzato, mantenendoli spazialmente separati, in modo da favorire lo sviluppo di colonie indipendenti originate da una quantità minima di materiale fungino. Tale approccio ha consentito di ridurre la possibilità di sovrapposizione tra microrganismi differenti e di facilitare il successivo ottenimento di colture pure.

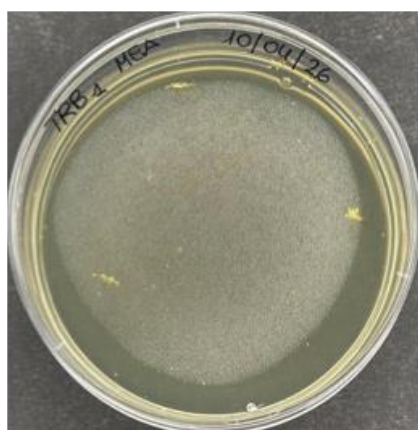


Figura 7. Tecnica dei tre punti

Al termine dell'inoculo, tutte le piastre sono state immediatamente richiuse, sigillate quando necessario ed etichettate riportando il codice identificativo dell'isolato, il campione di provenienza, il terreno di coltura utilizzato e la data di reisolamento. Per ogni passaggio è stata mantenuta la completa tracciabilità del campione, conservando il collegamento tra campione originale, piastra primaria, reisolamento e coltura pura finale.

Le colture sono state incubate a 24 ± 1 °C e monitorate a intervalli regolari per verificarne lo sviluppo. Nei casi in cui sulla stessa piastra fossero ancora presenti più morfotipi, oppure venissero osservate contaminazioni batteriche o fungine, il procedimento di isolamento è stato ripetuto trasferendo

nuovamente una porzione della colonia su un nuovo terreno di coltura. Il processo è stato reiterato fino all'ottenimento di colonie macroscopicamente omogenee e riconducibili a un singolo morfotipo. Parallelamente alle operazioni di reisolamento è stata effettuata una documentazione fotografica delle colture, acquisendo immagini delle piastre durante le diverse fasi di crescita. Le fotografie sono state utilizzate per documentare l'evoluzione morfologica delle colonie e per confrontare gli isolati ottenuti dai differenti campioni tessili e dai diversi terreni di coltura.

Per garantire una corretta organizzazione delle numerose colture ottenute è stato adottato un sistema di codifica alfanumerico progressivo, costruito sulla base del campione di provenienza, del terreno di isolamento e della numerazione dell'isolato. Tale sistema ha consentito di identificare univocamente ciascuna coltura durante tutte le fasi sperimentali, dal primo isolamento fino alle analisi finali.

L'isolamento in coltura pura è stato ripetuto per tutti i morfotipi ritenuti di interesse fino all'ottenimento di colture stabili e prive di contaminazioni visibili. Gli isolati così ottenuti hanno costituito il materiale biologico di partenza per le successive osservazioni microscopiche, per l'estrazione del DNA, per le analisi molecolari di identificazione e per la conservazione in collezione. L'utilizzo di un protocollo standardizzato di reisolamento ha permesso di ottenere colture caratterizzate da elevata omogeneità morfologica e buona riproducibilità della crescita, garantendo l'affidabilità delle successive analisi tassonomiche e molecolari. L'ottenimento di colture pure ha rappresentato pertanto un passaggio essenziale dell'intero studio, consentendo di associare ciascun isolato al rispettivo campione tessile e di ricostruire con precisione la successione delle specie fungine colonizzanti i diversi materiali analizzati.

3.5 Identificazione macro- e micro-morfologica

L'identificazione macro- e micro-morfologica degli isolati fungini ha rappresentato una fase preliminare del processo di caratterizzazione dei microrganismi ottenuti dai diversi materiali tessili analizzati. Tale procedura ha consentito di distinguere i differenti morfotipi sviluppatisi in coltura, verificare la purezza degli isolati ottenuti e selezionare le colonie destinate alle successive analisi molecolari.

L'analisi macro-morfologica è stata effettuata mediante esame visivo diretto delle colonie sviluppatesi sulle piastre di coltura. Per ciascun isolato sono state valutate le principali caratteristiche colturali, quali colore della colonia e del rovescio, diametro, velocità di crescita, consistenza, tessitura superficiale, morfologia dei margini, rilievo della colonia e presenza di strutture riproduttive macroscopicamente evidenti. Le osservazioni sono state eseguite a intervalli regolari durante l'incubazione, permettendo di monitorare l'evoluzione morfologica delle colture e di individuare eventuali differenze tra i diversi morfotipi isolati.

Successivamente, gli isolati ottenuti in coltura pura sono stati sottoposti a identificazione micro-morfologica mediante microscopio ottico Leica DM1000. I preparati microscopici sono stati allestiti prelevando, con ago sterile, una piccola porzione di micelio o di strutture sporifere dalla colonia e trasferendola su un vetrino portaoggetti. Al campione è stata aggiunta una goccia di acido lattico, utilizzato come mezzo di montaggio per facilitare l'osservazione delle strutture fungine, prima dell'applicazione del coprioggetto. L'osservazione microscopica ha consentito di valutare le principali caratteristiche morfologiche degli isolati, quali la struttura del micelio, la presenza o assenza di setti, la morfologia delle ife, dei conidiofori, delle fialidi, degli sporangi e delle spore, oltre alle altre strutture riproduttive utili a una preliminare attribuzione tassonomica.

L'integrazione delle osservazioni macro- e micro-morfologiche ha permesso di discriminare i differenti isolati ottenuti dai materiali tessili e di selezionare le colture pure da sottoporre alle successive analisi molecolari. L'identificazione morfologica ha inoltre consentito di verificare la purezza delle colture ottenute durante i successivi passaggi di isolamento e reisolamento, evidenziando l'eventuale presenza di contaminazioni o di differenti morfotipi all'interno della stessa piastra. Questa fase ha rappresentato un passaggio fondamentale per garantire che le analisi genetiche fossero eseguite esclusivamente su colture monospecifiche.

3.6 Conservazione degli isolati fungini: DNA stock e CRYO stock

Al termine delle procedure di isolamento in coltura pura, gli isolati fungini ottenuti sono stati sottoposti a procedure di conservazione finalizzate a garantirne la disponibilità per le successive analisi sperimentali e per eventuali studi futuri. La conservazione degli isolati rappresenta infatti una fase fondamentale del workflow microbiologico, poiché consente di preservare sia il materiale genetico sia la vitalità delle colture, mantenendo la tracciabilità degli isolati durante tutte le fasi dello studio.

Nel presente lavoro sono state adottate due differenti strategie di conservazione, complementari tra loro: la preparazione di DNA stock, destinati alle successive analisi molecolari, e la preparazione di CRYO stock, finalizzata al mantenimento degli isolati fungini vitali a lungo termine.

Per la preparazione dei DNA stock, gli isolati sono stati selezionati a partire da colture pure sviluppatesi sui terreni di coltura: operando in condizioni di sterilità sotto cappa a flusso laminare, una piccola quantità di micelio è stata prelevata mediante ago microbiologico sterile dalla porzione periferica della colonia, corrispondente all'area caratterizzata dalla crescita più attiva, e trasferita all'interno di microprovette sterili opportunamente identificate. Ogni provetta è stata etichettata mediante un codice identificativo univoco, riportante il numero dell'isolato e la relativa codifica sperimentale, consentendo di mantenere il collegamento tra il materiale conservato, il campione di

origine, il terreno di isolamento e le successive analisi microbiologiche e molecolari (**Figura 8**). La preparazione dei DNA stock ha avuto lo scopo di disporre di materiale biologico facilmente accessibile per le successive procedure di estrazione del DNA, amplificazione mediante PCR e sequenziamento. La disponibilità di una raccolta organizzata di isolati rappresenta infatti un requisito essenziale per garantire la riproducibilità delle analisi molecolari e ridurre il rischio di perdita del materiale biologico durante le diverse fasi sperimentali. Pur non consentendo il recupero del microrganismo vitale, il DNA stock costituisce una risorsa fondamentale per l'identificazione tassonomica e per le successive analisi genetiche degli isolati fungini. Nella **Tabella I** sono riportati, per ciascun isolato, il codice identificativo del DNA stock (DNA Stock), il numero di collezione CoLD (CoLD Number) e il codice identificativo della piastra (My Code) ottenuta successivamente alla preparazione del DNA stock.



Figura 8. Provette codificate contenenti gli isolati fungini destinati alla preparazione dei DNA stock.

DNA Code	ColD number	My Code
029-E1	038-B2	RB TNCC DB
029-E2	038-B3	RB TNCC CBA
029-E3	038-B4	RB TNCC BA
029-E4	038-B5	RB TNCC AA
029-E5	038-B6	MEA TNCC AA
029-E6	038-B7	RB BBC BA
029-E7	038-B8	MEA BBCAAA
029-E8	038-B9	RB TSB BA
029-E9	038-C1	RB TSB AA
029-F1	038-C2	RB STC BA
029-F2	038-C3	RB STC AA
029-F3	038-C4	RB BBC CA
029-F4	038-C5	RB BBC AA
029-F5	038-C6	MEA SWAB BG
030-E7	039-B8	RBC1A
030-E8	039-B9	MEAC2A
030-E9	039-C1	MEAC1A
030-F1	039-C2	RBC2A
033-G2	042-C8	TP2
033-G3	042-C9	TME1
033-G4	042-D1	RBHT2-1
029-F6	038-C7	MEA OA A
029-F7	038-C8	MEA OA B
029-F8	038-C9	MEA OA C
029-F9	038-D1	MEA OB A
029-G1	038-D2	MEA OB B
029-G2	038-D3	MEA OB C
029-G3	038-D4	MEA OC A
029-G4	038-D5	MEA OC B
029-G5	038-D6	MEA OC C

Tabella I. Codici dei ceppi fungini per l'identificazione molecolare.

Parallelamente è stata effettuata la preparazione dei CRYO stock, destinati alla conservazione a lungo termine degli isolati vitali. La crioconservazione rappresenta uno dei metodi maggiormente impiegati nelle collezioni microbiologiche, poiché consente di mantenere i microrganismi in uno stato metabolicamente inattivo, preservandone nel tempo vitalità, stabilità genetica e caratteristiche fenotipiche. A differenza della conservazione del solo materiale genetico, questa metodica permette infatti il successivo recupero della coltura vitale, rendendo possibile l'esecuzione di nuove colture e ulteriori analisi microbiologiche. La preparazione dei CRYO stock è stata eseguita in condizioni di sterilità sotto cappa a flusso laminare. Una porzione di micelio proveniente da colture pure è stata trasferita all'interno di provette contenenti Malt Extract Broth (MEB), utilizzato come terreno liquido di mantenimento. Successivamente è stato aggiunto glicerolo sterile al 30%, in volume pari a 0,5 mL, impiegato come agente crioprotettivo. Il glicerolo svolge un ruolo essenziale durante il congelamento, poiché riduce la formazione di cristalli di ghiaccio intracellulari responsabili di danni meccanici alle cellule fungine, aumentando così la sopravvivenza degli isolati durante la conservazione a basse temperature. Dopo l'aggiunta del crioprotettore, le sospensioni sono state omogeneizzate mediante vortex per ottenere una distribuzione uniforme del micelio all'interno del terreno liquido. I campioni sono stati quindi trasferiti in criovials sterili opportunamente etichettati e successivamente conservati a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, temperatura idonea al mantenimento a lungo termine delle colture fungine. Anche per le crioprovette è stato adottato un sistema di codifica univoco, mantenendo la corrispondenza tra ogni CRYO stock, il relativo isolato e tutta la documentazione sperimentale associata (**Figura 9**).



Figura 9. Crioprovette (CRYO stock) codificate per la conservazione degli isolati fungini vitali a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Durante l'intero processo di conservazione è stata posta particolare attenzione alla corretta identificazione dei campioni. Ogni isolato è stato associato a un codice progressivo riportato sia sulle provette destinate al DNA stock sia sulle crioprovette destinate alla conservazione a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (**Tabella II**).

ColD number	My Code	DNA Code
038-B2	RB TNCC DB	029-E1
038-B3	RB TNCC CBA	029-E2
038-B4	RB TNCC BA	029-E3
038-B5	RB TNCC AA	029-E4
038-B6	MEA TNCC AA	029-E5
038-B7	RB BBC BA	029-E6
038-B8	MEA BBCAAA	029-E7
038-B9	RB TSB BA	029-E8
038-C1	RB TSB AA	029-E9
038-C2	RB STC BA	029-F1
038-C3	RB STC AA	029-F2
038-C4	RB BBC CA	029-F3
038-C5	RB BBC AA	029-F4
038-C6	MEA SWAB BG	029-F5
039-B8	RBC1A	030-E7
039-B9	MEAC2A	030-E8
039-C1	MEAC1A	030-E9
039-C2	RBC2A	030-F1
042-C8	TP2	033-G2
042-C9	TME1	033-G3
042-D1	RBHT2-1	033-G4
038-C7	MEA OA A	029-F6
038-C8	MEA OA B	029-F7
038-C9	MEA OA C	029-F8
038-D1	MEA OB A	029-F9
038-D2	MEA OB B	029-G1
038-D3	MEA OB C	029-G2
038-D4	MEA OC A	029-G3
038-D5	MEA OC B	029-G4
038-D6	MEA OC C	029-G5

Tabella II. Database dei CRYO stock.

Tale sistema ha consentito di mantenere la completa tracciabilità del materiale biologico durante tutte le fasi dello studio, evitando possibili errori di identificazione e permettendo di associare ciascun campione ai dati relativi al campione di provenienza, alle caratteristiche morfologiche osservate, ai terreni di isolamento e ai risultati delle successive analisi molecolari. L'adozione di un sistema di codifica standardizzato rappresenta una pratica consolidata nella gestione delle collezioni microbiologiche, poiché facilita l'archiviazione del materiale biologico, la consultazione dei dati sperimentali e l'eventuale recupero degli isolati conservati. Tutti gli isolati ottenuti sono stati depositati presso la ColD – Collection of DISTAV, garantendone la conservazione, la tracciabilità e la futura disponibilità per eventuali studi comparativi o approfondimenti sperimentali.

Nel presente studio, tale approccio ha consentito di organizzare in maniera sistematica tutti gli isolati ottenuti dai differenti materiali tessili, garantendo la continuità tra le diverse fasi sperimentali e la completa rintracciabilità di ciascun campione.

In conclusione, l'integrazione di entrambe le metodiche ha permesso di preservare sia il patrimonio genetico sia la vitalità degli isolati fungini ottenuti nel corso dello studio, assicurando la disponibilità del materiale biologico per tutte le successive fasi sperimentali e per eventuali approfondimenti futuri.

3.7 Identificazione molecolare

L'identificazione molecolare è stata eseguita al fine di confermare l'attribuzione tassonomica degli isolati fungini ottenuti dai diversi materiali tessili sottoposti a biodeterioramento. L'approccio molecolare ha consentito di identificare con maggiore accuratezza i generi fungini isolati, integrando le osservazioni macro- e micromorfologiche effettuate sulle colture pure.

L'analisi è stata condotta mediante estrazione del DNA fungino degli isolati selezionati, seguita dall'amplificazione mediante Polymerase Chain Reaction (PCR) della regione Internal Transcribed Spacer (ITS), considerata il principale marcatore molecolare per l'identificazione dei funghi. I prodotti di amplificazione sono stati successivamente sottoposti a sequenziamento e le sequenze ottenute sono state confrontate con quelle depositate nei principali database internazionali, consentendo l'identificazione tassonomica degli isolati.

3.7.1 Estrazione del DNA

L'estrazione del DNA rappresenta una fase fondamentale delle analisi molecolari, poiché consente di ottenere materiale genetico di elevata qualità, idoneo alle successive procedure di amplificazione mediante PCR, sequenziamento e identificazione tassonomica degli isolati fungini. La qualità, la purezza e l'integrità del DNA influenzano direttamente l'affidabilità delle analisi successive; per

questo motivo è stato impiegato un protocollo standardizzato, in grado di garantire risultati riproducibili e ridurre il rischio di contaminazioni.

Nel presente studio l'estrazione del DNA è stata eseguita utilizzando il DNeasy® UltraClean® Microbial Kit (Qiagen, Hilden, Germania), seguendo il protocollo Quick-Start fornito dal produttore. Tutte le operazioni sono state svolte in condizioni di sterilità mediante l'impiego di micropipette automatiche Eppendorf Research® plus, puntali sterili monouso e microprovette sterili. Le fasi di omogeneizzazione dei campioni sono state effettuate mediante Vortex-Genie 2® (Scientific Industries, USA), mentre le centrifugazioni sono state eseguite utilizzando una microcentrifuga Thermo Scientific™ MicroCL 17 (Thermo Fisher Scientific, USA). I principali reagenti del kit e la strumentazione utilizzata durante la procedura sono riportati in **Figura 10**

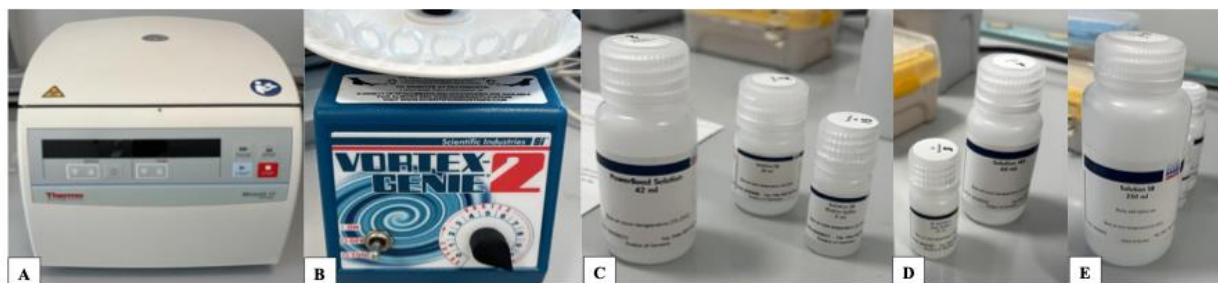


Figura 10. Materiali e strumentazione utilizzati per l'estrazione del DNA fungino mediante DNeasy® UltraClean® Microbial Kit (Qiagen, Hilden, Germania). **A)** Microcentrifuga. **B)** Vortex. **C)** Reagenti del kit. **D)** Solution SL e Solution IRS. **E)** Solution SB.

Per ciascun isolato fungino è stata prelevata una coltura pura in fase attiva di crescita. Un volume di 1,8 mL di sospensione microbica è stato trasferito in una microprovetta sterile da 2 mL e sottoposto a centrifugazione a $10.000 \times g$ per 30 secondi a temperatura ambiente. Terminata la centrifugazione, il surnatante è stato accuratamente eliminato e il campione è stato sottoposto ad una seconda centrifugazione nelle medesime condizioni, al fine di rimuovere completamente il liquido residuo e ottenere un pellet cellulare compatto, costituito principalmente dal micelio fungino. Successivamente il pellet è stato risospeso in 300 μ L di PowerBead Solution e trasferito nelle apposite PowerBead Tubes, contenenti microsfere ceramiche necessarie alla disaggregazione meccanica delle cellule. Alla sospensione sono stati quindi aggiunti 50 μ L di Solution SL (Lysis Buffer), tampone di lisi che favorisce la rottura delle membrane cellulari e la liberazione del contenuto intracellulare. Le provette sono state sottoposte ad agitazione mediante Vortex-Genie 2® alla massima velocità per circa 10 minuti. Durante questa fase l'azione combinata delle microsfere ceramiche e del tampone di lisi determina la disaggregazione della parete cellulare fungina e il rilascio del DNA. La lisi meccanica rappresenta una strategia particolarmente efficace per i funghi filamentosi, poiché tali microrganismi

possiedono una parete cellulare ricca di chitina, β -glucani e altri polisaccaridi strutturali, caratterizzata da una notevole resistenza meccanica. L'impiego delle PowerBead Tubes consente quindi di incrementare l'efficienza della lisi e migliorare la resa complessiva dell'estrazione. Al termine della lisi i campioni sono stati centrifugati a $10.000 \times g$ per 30 secondi e il surnatante contenente il DNA è stato trasferito in una nuova microprovetta sterile. Per la rimozione delle sostanze potenzialmente interferenti sono stati aggiunti 100 μ L di Solution IRS (Inhibitor Removal Solution), seguiti da agitazione mediante vortex per circa 5 secondi e incubazione a 4 °C per 5 minuti. Tale passaggio permette la precipitazione di numerosi composti inibitori, quali proteine, polisaccaridi e altri metaboliti cellulari, migliorando la purezza del DNA e favorendo il corretto svolgimento delle successive reazioni enzimatiche. Dopo una centrifugazione a $10.000 \times g$ per 1 minuto, il surnatante è stato trasferito in una nuova provetta evitando accuratamente il pellet formatosi. Alla soluzione ottenuta sono stati aggiunti 900 μ L di Solution SB (Binding Buffer), tampone che favorisce il legame selettivo del DNA alla membrana di silice presente nella MB Spin Column. La miscela è stata caricata progressivamente sulla colonna di purificazione e centrifugata a $10.000 \times g$ per 30 secondi, ripetendo l'operazione fino al completo trasferimento del campione. Successivamente è stata effettuata la fase di lavaggio mediante aggiunta di 300 μ L di Solution CB (Wash Buffer) e centrifugazione a $10.000 \times g$ per 30 secondi. Questo passaggio ha consentito la rimozione di proteine residue, sali e altri contaminanti adsorbiti sulla membrana della colonna. Per eliminare completamente eventuali residui del tampone di lavaggio è stata eseguita un'ulteriore centrifugazione a $10.000 \times g$ per 1 minuto, ottenendo una membrana completamente asciutta. La colonna è stata quindi trasferita in una nuova microprovetta sterile e il DNA è stato eluito mediante aggiunta di 50 μ L di Solution EB (Elution Buffer) direttamente al centro della membrana filtrante. Dopo una centrifugazione finale a $10.000 \times g$ per 30 secondi, il DNA purificato è stato recuperato nella provetta di raccolta, ottenendo un estratto idoneo alle successive analisi molecolari. Al termine della procedura, ciascun estratto di DNA è stato trasferito in microprovette sterili opportunamente etichettate mediante un codice identificativo univoco, così da garantirne la completa tracciabilità durante tutte le fasi sperimentali (**Figura 11**). Le aliquote sono state conservate a -20 °C fino al loro utilizzo nelle successive analisi di biologia molecolare.

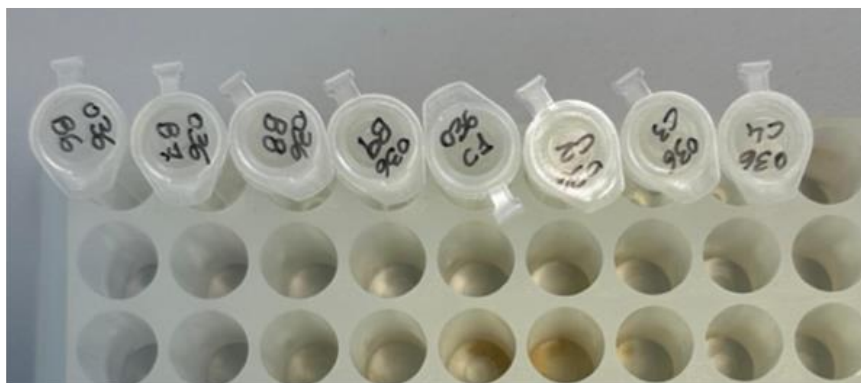


Figura 11. Aliquote di DNA estratto dagli isolati fungini, conservate in microprovette identificate mediante codice univoco e mantenute a -20°C fino alle successive analisi molecolari.

Il DNA estratto è stato successivamente impiegato per l'amplificazione della regione ITS (Internal Transcribed Spacer) mediante PCR, il sequenziamento e la successiva identificazione molecolare degli isolati fungini attraverso il confronto delle sequenze ottenute con quelle depositate nelle principali banche dati genetiche. L'utilizzo del kit DNeasy® UltraClean® Microbial Kit ha consentito di ottenere estratti di DNA caratterizzati da un adeguato grado di purezza e qualità, rendendoli idonei alle successive fasi di caratterizzazione molecolare degli isolati fungini provenienti dai differenti materiali tessili analizzati.

3.7.2 Amplificazione mediante PCR

Successivamente all'estrazione del DNA, gli isolati fungini sono stati sottoposti ad amplificazione mediante Polymerase Chain Reaction (PCR), tecnica di biologia molecolare che consente di ottenere un'elevata quantità di copie di una specifica regione del DNA a partire da quantità inizialmente molto ridotte di acido nucleico. Grazie alla sua elevata sensibilità e specificità, la PCR rappresenta una delle metodologie più utilizzate per l'identificazione molecolare dei microrganismi ed è ampiamente applicata negli studi microbiologici, ambientali e forensi (Mullis e Faloona, 1987; Analytical Methods Committee, 2014). Per ogni isolato fungino è stata predisposta una miscela di reazione (master mix) costituita da tampone di reazione (Buffer), cloruro di magnesio (MgCl_2), deossinucleotidi trifosfato (dNTPs), primer specifici, acqua ultrapura e DNA polimerasi termostabile. Tutti i reagenti sono stati scongelati prima dell'utilizzo e miscelati mediante vortex per ottenere una soluzione omogenea. Successivamente sono stati distribuiti $24\ \mu\text{L}$ della master mix all'interno di provette PCR precedentemente codificate, ai quali è stato aggiunto $1\ \mu\text{L}$ del DNA estratto da ciascun isolato, ottenendo un volume finale di reazione pari a $25\ \mu\text{L}$. Per ciascuna sessione di amplificazione sono stati inoltre predisposti controlli negativi contenenti tutti i componenti della miscela di reazione, inclusi i primer, ma privi di DNA stampo. Al termine della PCR, tali controlli non

hanno mostrato bande di amplificazione, confermando l'assenza di contaminazioni rilevabili durante la preparazione delle reazioni. Come primo target molecolare è stata amplificata la regione ITS (Internal Transcribed Spacer), riconosciuta come il principale barcode universale per l'identificazione dei funghi grazie all'elevata variabilità interspecifica e all'ampia disponibilità di sequenze di riferimento nei database internazionali (White et al., 1990; Schoch et al., 2012). Le reazioni di amplificazione sono state eseguite mediante termociclatore seguendo programmi specifici per ciascuna coppia di primer. Ogni ciclo di PCR comprende tre fasi fondamentali: denaturazione, durante la quale il DNA a doppio filamento viene separato in filamenti singoli mediante esposizione ad elevate temperature; annealing, che consente ai primer di legarsi alle regioni complementari del DNA bersaglio; ed estensione, nella quale la DNA polimerasi sintetizza i nuovi filamenti incorporando progressivamente i nucleotidi. La ripetizione ciclica di queste tre fasi determina un'amplificazione esponenziale della regione di interesse (Saiki et al., 1988; Analytical Methods Committee, 2014). Al termine della PCR, l'avvenuta amplificazione è stata verificata mediante elettroforesi su gel di agarosio. Per ciascun campione sono stati caricati circa 5 μ L del prodotto di PCR nei pozzetti del gel insieme ad un marcatore di peso molecolare. Applicando un campo elettrico, i frammenti di DNA, caricati negativamente, migrano verso il polo positivo separandosi in funzione della loro dimensione. L'osservazione delle bande di amplificazione ha consentito di verificare il corretto esito della reazione e di selezionare esclusivamente i campioni risultati positivi per le successive analisi di sequenziamento (**Fig.12**).

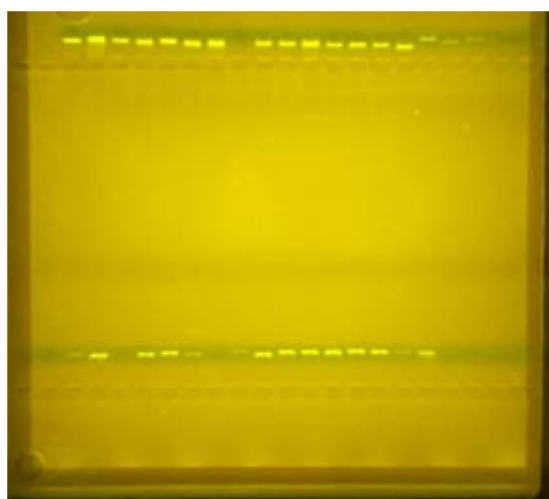


Figura 12. Elettroforesi su gel di agarosio dei prodotti di PCR degli isolati fungini, eseguita per verificare l'avvenuta amplificazione delle regioni target prima del sequenziamento.

3.7.3 Sequenziamento e identificazione dei generi fungini

I prodotti di PCR risultati positivi all'analisi elettroforetica sono stati inviati a un laboratorio specializzato per il sequenziamento nucleotidico delle regioni amplificate. Dal sequenziamento sono stati ottenuti i relativi cromatogrammi, successivamente sottoposti a controllo qualitativo mediante eliminazione delle porzioni iniziali e finali caratterizzate da una minore qualità di lettura e correzione delle eventuali basi ambigue. Dalle sequenze così elaborate sono stati generati file in formato FASTA, utilizzati per le successive analisi bioinformatiche. L'identificazione tassonomica degli isolati è stata effettuata mediante confronto delle sequenze ottenute con quelle depositate nel database GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI), utilizzando l'algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul et al., 1990). Tale algoritmo consente di confrontare una sequenza nucleotidica con le sequenze disponibili nel database e di individuare quelle caratterizzate dal maggiore grado di similarità. Nell'interpretazione dei risultati ottenuti mediante BLAST sono stati considerati principalmente la percentuale di identità (% identity) e la copertura dell'allineamento (query coverage). La percentuale di identità esprime la proporzione di nucleotidi corrispondenti tra la sequenza analizzata e la sequenza di riferimento lungo la regione allineata, mentre la query coverage indica la percentuale della sequenza analizzata coinvolta nell'allineamento. Nel presente studio, ai fini dell'attribuzione tassonomica, sono stati privilegiati i risultati BLAST caratterizzati da elevata query coverage e da percentuali di identità superiori al 97%. Nei casi in cui tali soglie non fossero pienamente raggiunte, è stato comunque considerato il miglior risultato disponibile, valutando congiuntamente query coverage, percentuale di identità, E-value e coerenza con l'identificazione morfologica. Per ciascun confronto BLAST è stato inoltre riportato l'accession number della sequenza di riferimento depositata in GenBank che mostrava la maggiore corrispondenza con la sequenza dell'isolato analizzato. L'accession number rappresenta il codice identificativo univoco assegnato alla sequenza di riferimento presente nel database e consente di rintracciarne le relative informazioni tassonomiche e molecolari. I codici riportati nel presente studio si riferiscono pertanto alle sequenze di riferimento utilizzate per il confronto e non alle sequenze ottenute dagli isolati analizzati.

Come principale target molecolare per l'identificazione fungina è stata utilizzata la regione ITS (Internal Transcribed Spacer), ampiamente riconosciuta come barcode di riferimento per i funghi grazie alla sua variabilità interspecifica e all'elevata disponibilità di sequenze depositate nelle principali banche dati internazionali (White et al., 1990; Schoch et al., 2012). L'analisi della regione ITS consente generalmente una prima attribuzione tassonomica degli isolati, sebbene il suo potere discriminante possa risultare limitato per alcuni gruppi fungini o per specie filogeneticamente affini.

Nel presente studio non sono stati impiegati marcatori molecolari secondari. Tuttavia, in future analisi, loci maggiormente discriminanti potranno essere utilizzati per confermare o affinare le identificazioni ottenute mediante ITS, soprattutto nei casi in cui quest'ultima non consenta una risoluzione tassonomica sufficiente. L'identificazione molecolare è stata infine valutata congiuntamente alle caratteristiche macro- e micromorfologiche osservate nelle colture pure, al fine di ottenere l'attribuzione tassonomica più affidabile possibile degli isolati analizzati.

3.8 Metodi per la valutazione della diversità fungina

La caratterizzazione della componente fungina associata ai differenti campioni è stata integrata mediante il calcolo di indici di diversità, allo scopo di descrivere quantitativamente la struttura dell'insieme degli isolati fungini recuperati. La diversità non dipende infatti esclusivamente dal numero di taxa rilevati, ma anche dalla loro distribuzione relativa all'interno del campione. Nell'analisi delle comunità microbiche, la valutazione della diversità all'interno di un singolo campione viene comunemente ricondotta al concetto di α -diversità e può essere effettuata mediante misure di ricchezza e indici che tengono conto delle abbondanze relative dei diversi taxa (Li et al., 2012; Lozupone & Knight, 2008). Tali approcci sono ampiamente utilizzati per sintetizzare quantitativamente la struttura delle comunità microbiche.

Nel presente studio, l'analisi è stata applicata agli isolati fungini coltivabili ottenuti dai quattro campioni e successivamente sottoposti a identificazione tassonomica. Per ciascun campione è stata innanzitutto determinata la ricchezza osservata (S), definita come il numero di taxa differenti rilevati tra gli isolati identificati. Poiché l'identificazione non ha raggiunto per tutti gli isolati il medesimo livello tassonomico, il termine *taxon* è stato utilizzato in senso operativo per indicare ciascuna categoria tassonomica effettivamente riconosciuta mediante l'integrazione delle analisi colturali, morfologiche e molecolari. Il calcolo è stato effettuato esclusivamente sugli isolati per i quali era disponibile un'attribuzione tassonomica. Questa impostazione è coerente con quella già adottata nel dataset della tesi. Oltre alla ricchezza osservata, sono stati calcolati gli indici di Shannon e Simpson, scelti poiché consentono di integrare in una singola misura il numero di taxa osservati e la loro rappresentazione relativa. I due indici non forniscono informazioni completamente sovrapponibili, poiché attribuiscono un peso differente alle componenti della distribuzione; il loro utilizzo congiunto consente pertanto una descrizione più articolata della diversità degli isolati recuperati (Morris et al., 2014).

L'indice di Shannon (H') è stato calcolato secondo la formula: $H' = -\sum p_i \ln(p_i)$, dove p_i rappresenta, per ciascun campione, la proporzione degli isolati attribuiti al taxon i rispetto al numero totale degli isolati identificati considerati nel calcolo. L'indice di Shannon combina quindi l'informazione

relativa alla ricchezza tassonomica con quella relativa alla distribuzione proporzionale degli isolati tra i diversi taxa (Lozupone & Knight, 2008; Morris et al., 2014).

L'indice di Simpson è stato utilizzato nella forma complementare $1-D$, secondo la formula: $1-D = 1 - \sum p_i^2$, dove p_i rappresenta nuovamente la proporzione degli isolati appartenenti al taxon i . La forma complementare dell'indice esprime la probabilità che due unità selezionate casualmente appartengano a taxa differenti e fornisce una misura particolarmente sensibile alla distribuzione delle abbondanze e alla presenza di taxa dominanti (Morris et al., 2014). L'impiego congiunto di Shannon e Simpson è stato pertanto preferito all'utilizzo di un singolo indice, poiché permette di descrivere la struttura degli isolati recuperati considerando in maniera complementare ricchezza e distribuzione relativa.

L'applicazione di tali indici ai dati ottenuti nel presente studio è metodologicamente possibile perché, per ciascun campione, sono disponibili sia l'identità tassonomica degli isolati sia il numero di isolati attribuiti a ciascun taxon. Questi dati consentono di determinare le frequenze relative (p_i) necessarie per il calcolo di Shannon e Simpson. Gli indici sono stati quindi applicati alle frequenze degli isolati identificati e non alla semplice presenza o assenza dei taxa. L'impiego di misure di diversità basate sulla ricchezza e sulle abbondanze relative è consolidato nella caratterizzazione quantitativa delle comunità microbiche (Li et al., 2012; Lozupone & Knight, 2008).

L'applicazione degli indici di diversità ai dati ottenuti nel presente studio presenta alcuni limiti metodologici che devono essere considerati nella loro interpretazione.

Un primo aspetto riguarda la dipendenza delle misure di diversità dal campionamento. La ricchezza osservata è particolarmente sensibile al numero di unità campionate e alla completezza con cui una comunità viene rappresentata; campioni di diversa dimensione o completezza possono pertanto restituire valori differenti anche indipendentemente da reali differenze nella diversità delle comunità considerate (Chao & Jost, 2012). Lozupone e Knight (2008) evidenziano analogamente come alcune misure di diversità siano sensibili alle differenze nel numero, nella distribuzione e nell'estensione dei punti/aree di prelievo e come l'uso di procedure di rarefazione o di stima della ricchezza possa risultare necessario quando si intende descrivere in maniera esaustiva la diversità di una comunità. Nel presente studio tale limite assume particolare rilevanza, poiché il numero e la distribuzione dei punti di campionamento sono stati adattati alla superficie, alla conformazione e alle caratteristiche macroscopiche dei differenti campioni e non sono stati standardizzati tra i quattro materiali. Anche Gadd et al. (2024) sottolineano come la quantità di materiale ottenibile attraverso il campionamento e la difficoltà di standardizzare i protocolli su substrati molto differenti possano condizionare la rappresentatività e l'interpretazione dei dati microbiologici.

Un secondo limite è legato alla natura culture-dependent dell'analisi. Gli indici sono stati calcolati esclusivamente sugli isolati fungini in grado di crescere nelle condizioni culturali adottate. Le

metodiche basate sulla coltivazione possono determinare una selezione dei microrganismi in funzione del metodo di campionamento, del terreno utilizzato e della temperatura di incubazione e non consentono di rilevare la componente non coltivabile della comunità (WHO, 2009). Li et al. (2012) ricordano infatti che una parte molto ampia della diversità microbica non è accessibile mediante le tecniche colturali convenzionali e che gli approcci molecolari culture-independent hanno permesso di evidenziare una diversità precedentemente non rilevata. Di conseguenza, Shannon e Simpson descrivono nel presente studio la struttura degli isolati fungini coltivabili recuperati, senza poter essere considerati una stima esaustiva della comunità fungina originariamente presente sui campioni. Un ulteriore elemento di cautela riguarda il fatto che nessun singolo indice sintetizza tutti gli aspetti della diversità. Lozupone e Knight (2008) sottolineano esplicitamente che un singolo valore non è in grado di rappresentare tutte le componenti della diversità e che misure differenti possono mettere in evidenza aspetti diversi della struttura di una comunità. Morris et al. (2014) mostrano inoltre come ricchezza, Shannon, Simpson, dominanza ed equitabilità forniscano informazioni parzialmente differenti e possano rispondere in modo diverso alla struttura delle abbondanze; per questo motivo l'impiego congiunto di più misure risulta più informativo rispetto all'utilizzo di un singolo indice. Nel presente studio Shannon e Simpson sono stati pertanto utilizzati in modo complementare e non come misure intercambiabili della diversità.

Deve inoltre essere considerata la sensibilità degli indici alla distribuzione delle abbondanze, soprattutto quando sono presenti taxa poco rappresentati. Li et al. (2012), analizzando comunità microbiche, hanno evidenziato che gli indici ecologici convenzionali non sempre descrivono adeguatamente la variabilità associata ai taxa a bassa abbondanza, che possono rappresentare una componente importante della diversità complessiva. Tale aspetto richiede particolare cautela nell'interpretazione dei dati del presente studio, nei quali alcune categorie tassonomiche sono rappresentate da un numero molto limitato di isolati.

Un ulteriore limite riguarda la risoluzione tassonomica. Lozupone e Knight (2008) evidenziano che le misure basate esclusivamente su categorie tassonomiche possono non rappresentare completamente la diversità biologica, poiché trattano le unità tassonomiche come equivalenti senza considerare il diverso grado di divergenza tra di esse. Nel presente studio, inoltre, non tutti gli isolati hanno raggiunto il medesimo livello di identificazione tassonomica. Gadd et al. (2024) sottolineano che anche l'identificazione molecolare può essere condizionata dalla risoluzione dei marcatori utilizzati e dalla disponibilità di sequenze di riferimento correttamente identificate nei database. Per questo motivo, il termine *taxon* è stato utilizzato in senso operativo per indicare le categorie tassonomiche effettivamente riconosciute mediante le analisi morfologiche e molecolari.

Infine, la ricchezza osservata non deve essere interpretata come ricchezza totale della comunità. Chao e Jost (2012) mostrano che la ricchezza campionaria dipende fortemente dalla dimensione e dalla completezza del campione e che, soprattutto in comunità contenenti taxa rari, il numero di taxa osservati può continuare ad aumentare all'aumentare del campionamento. Analogamente, Morris et al. (2014), per verificare l'affidabilità della ricchezza osservata, confrontano il numero di taxa rilevati con diversi stimatori della ricchezza totale basati sulle curve di accumulo. Nel presente lavoro non sono state applicate procedure di rarefazione, extrapolazione o stima della completezza del campionamento; la ricchezza è stata pertanto considerata esclusivamente come ricchezza tassonomica osservata negli isolati recuperati.

Alla luce di tali limitazioni, la ricchezza osservata e gli indici di Shannon e Simpson sono stati utilizzati esclusivamente come misure descrittive ed esplorative della struttura degli isolati fungini coltivabili recuperati. I valori ottenuti non sono stati interpretati come stime esaustive della biodiversità fungina dei campioni o degli ambienti di provenienza, né come base per confronti statistici inferenziali tra i quattro materiali, ma come strumenti complementari alla caratterizzazione tassonomica e alla descrizione della distribuzione relativa dei taxa identificati.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

L'identificazione molecolare degli isolati fungini, effettuata mediante il sequenziamento della regione ITS (*Internal Transcribed Spacer*) e il successivo confronto delle sequenze ottenute con quelle depositate nelle banche dati di riferimento mediante BLAST, secondo le procedure descritte nel paragrafo 3.7.3, ha consentito di ottenere le attribuzioni tassonomiche riportate nella **Tabella III**. Per ciascun isolato sono indicati il miglior match ottenuto, la query cover, l'E-value, la percentuale di identità e l'*accession number* della sequenza *GenBank* di riferimento con maggiore similarità.

Nel complesso, la maggior parte degli isolati ha mostrato valori di query cover pari al 100% e percentuali di identità elevate, generalmente superiori al 98%, consentendo di affinare l'attribuzione tassonomica precedentemente ottenuta a livello morfologico. In diversi casi è stato possibile raggiungere un'identificazione a livello di specie, come per *Penicillium citrinum*, *Trichoderma koningiopsis*, *T. longibrachiatum*, *T. erinaceum*, *T. koningii*, *Fusarium oxysporum*, *Stachybotrys chlorohalonatus*, *Fusarium acuminatum*, *Pestalotiopsis maculiformans*, *Penicillium elantae*, *Alternaria brassicae*, *Penicillium dipodomyicola*, *Cladosporium eucommiae*, *Trichoderma harzianum* e *Mucor circinelloides*. Per alcuni isolati, la denominazione restituita dal confronto BLAST corrisponde a nomenclature storiche o sinonimiche; è il caso di *Hypocrea koningii*, attualmente riconosciuto come *Trichoderma koningii* e di *Lewia infectoria*, oggi indicato come *Alternaria infectoria*.

I risultati ottenuti non presentano tuttavia lo stesso livello di supporto molecolare. L'isolato 030-E7, attribuito come miglior match a *Cladosporium halotolerans*, presenta una percentuale di identità molto elevata, pari al 99,66%, ma una query cover del 65%. La ridotta estensione della sequenza allineata limita quindi la robustezza dell'attribuzione a livello di specie e rende necessario interpretare il dato con cautela e in associazione alle evidenze morfologiche. Una considerazione analoga riguarda l'isolato 029-E1, attribuito a *Humicola fuscoatra*, per il quale la percentuale di identità è pari al 99,56% ma la query cover raggiunge soltanto l'80%, inferiore rispetto alla maggior parte degli altri isolati. Un ulteriore caso che richiede cautela interpretativa è rappresentato dall'isolato 029-G2. Il miglior match BLAST corrisponde a *Curvularia pseudolunata*, con query cover del 100%, ma con una percentuale di identità pari al 96,88%, valore inferiore rispetto a quello osservato per gli altri isolati e più basso rispetto alla soglia del 97% adottata come riferimento nel presente studio. L'attribuzione è stata pertanto mantenuta come migliore corrispondenza disponibile, ma non viene considerata equivalente, in termini di solidità molecolare, alle identificazioni caratterizzate contemporaneamente da elevata copertura e percentuali di identità superiori.

Le identificazioni molecolari ottenute saranno approfondite nei paragrafi dedicati ai singoli reperti, nei quali verranno integrate con le osservazioni macro- e micro-morfologiche, con le caratteristiche dei materiali analizzati e con le rispettive condizioni microambientali. Tale approccio consente di distinguere le identificazioni caratterizzate da un supporto molecolare più robusto da quelle che richiedono maggiore cautela, evitando di attribuire il medesimo grado di certezza a risultati BLAST caratterizzati da parametri differenti.

Campione	Isolato	Identificazione	Query cover (%)	E-value	Identità (%)	GenBank accession number of the best-matching reference sequence
Camicia	029-E1	<i>Humicola fuscoatra</i> Traaen	80	0.0	99,56	MT557341.1
Camicia	029-E3	<i>Penicillium citrinum</i> Thom	100	0.0	99,52	OR625120.1
Camicia	029-E4	<i>Penicillium citrinum</i>	100	0.0	99,52	OR625120.1
Camicia	029-E5	<i>Trichoderma koningiopsis</i> Samuels, C. Suárez & H.C. Evans	100	0.0	99,67	ON074847.1
Camicia	029-E6	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> Rifai	100	0.0	99,02	PP336466.1
Camicia	029-E7	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	100	0.0	99,02	PP336466.1
Camicia	029-E8	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	100	0.0	99,02	PP336466.1

Campione	Isolato	Identificazione	Query cover (%)	E-value	Identità (%)	GenBank accession number of the best-matching reference sequence
Camicia	029-E9	<i>Trichoderma koningii</i> Oudem	100	0.0	99,00	AJ301990.1
Camicia	029-F1	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	100	0.0	99,02	PP336466.1
Camicia	029-F2	<i>Trichoderma erinaceum</i> Bissett, C.P. Kubicek e Szakacs	100	0.0	99,31	OM515057.1
Camicia	029-F3	<i>Trichoderma koningii</i>	100	0.0	99,76	AJ301990.1
Camicia	029-F4	<i>Fusarium oxysporum</i> Schltdl	100	0.0	99,88	PP808764.1
Camicia	029-F5	<i>Penicillium citrinum</i>	100	0.0	99,35	OR625120.1
Ombrellone	029-F6	<i>Stachybotrys chlorohalonatus</i> B. Andersen & Thrane	100	0.0	99,42	AF081468.2
Ombrellone	029-F7	<i>Fusarium acuminatum</i> Ellis & Everh	100	0.0	98,82	PP336537.1

Campione	Isolato	Identificazione	Query cover (%)	E-value	Identità (%)	GenBank accession number of the best-matching reference sequence
Ombrellone	029-F8	<i>Pestalotiopsis maculiformans</i> (Guba & Zeller) Steyaert	100	0.0	98,02	EU552146.1
Ombrellone	029-F9	<i>Pestalotiopsis maculiformans</i>	100	0.0	98,56	EU552146.1
Ombrellone	029-G1	<i>Pestalotiopsis maculiformans</i>	100	0.0	98,56	EU552146.1
Ombrellone	029-G2	<i>Curvularia pseudolunata</i> Da Cunha, Madrid & Gené	100	0.0	96,88	ON332842.1
Ombrellone	029-G3	<i>Pestalotiopsis maculiformans</i>	100	0.0	98,56	EU552146.1
Ombrellone	029-G4	<i>Penicillium elantae</i> Y.P. Tan, Minns, Sbaraini & E. Lacey	100	0.0	98,63	PZ123760.1
Ombrellone	029-G5	<i>Alternaria brassicae</i> (Berk.) Sacc.	100	0.0	98,50	HQ674659.1
Cintura	030-E7	<i>Cladosporium halotolerans</i> Zalar, de Hoog & Gunde-Cim	65	0.0	99,66	OQ608646.1

Campione	Isolato	Identificazione	Query cover (%)	E-value	Identità (%)	GenBank accession number of the best-matching reference sequence
Cintura	030-E8	<i>Alternaria infectoria</i> E.G. Simmons	100	0.0	99,79	AY154690.1
Cintura	030-E9	<i>Penicillium dipodomyicola</i> (Frisvad, Filt. & Wicklow) Frisvad	100	0.0	99,46	DQ339570.1
Cintura	030-F1	<i>Cladosporium eucommiae</i> Si Y. Wang, Yong Wang bis & Yan Li	100	0.0	100,00	LC847968.1
Copridivano	033-G2	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai	100	0.0	99,88	PZ227451.1
Copridivano	033-G3	<i>Mucor circinelloides</i> Tiegh	100	0.0	99,77	PP956631.1
Copridivano	033-G4	<i>Trichoderma harzianum</i>	100	0.0	99,77	LC921186.1

Tabella III. Risultati dell'identificazione molecolare mediante BLAST delle sequenze ITS, con query coverage, E-value, percentuale di identità e accession number GenBank.

4.1 Camicia di cotone

La camicia di cotone ha mostrato una composizione tassonomica eterogenea degli isolati fungini recuperati, con la presenza di quattro differenti taxa.

Prima del campionamento, il manufatto è stato inserito all'interno di una busta di plastica, interrato presso l'Orto Botanico dell'Università di Genova, al fine di simulare l'esposizione a un ambiente naturale, e successivamente conservato all'interno della stessa busta di plastica per ricreare un microambiente chiuso caratterizzato da elevata umidità. Per ottenere una caratterizzazione rappresentativa della comunità fungina associata al campione, il campionamento è stato effettuato in differenti aree della camicia, comprendenti il colletto, diverse porzioni del tessuto (avanti e dietro del busto), i brandelli della camicia e la superficie interna della busta di plastica utilizzata per la conservazione. L'osservazione macroscopica ha evidenziato alterazioni distribuite in maniera eterogenea sulla superficie del campione, con la presenza di differenti morfotipi coloniali nelle aree successivamente sottoposte a campionamento (**Figura 13**). Inoltre, sono state osservate tracce di colonizzazione fungina anche sulla superficie interna della busta di plastica, indicando che lo sviluppo della comunità micologica interessava non solo il campione tessile, ma anche il microambiente confinato nel quale esso era stato conservato.

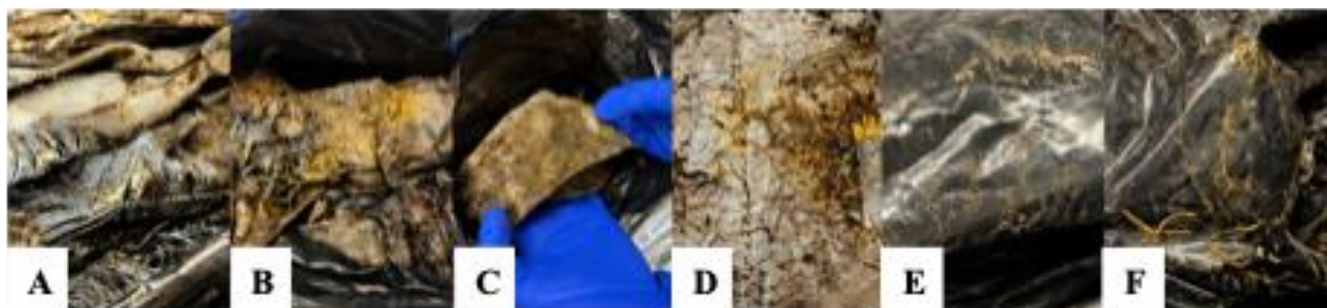


Figura 13. Aspetto macroscopico della camicia di cotone prima del campionamento microbiologico. **A–B)** Lato anteriore e posteriore del campione. **C–D)** Colletto osservato da differenti prospettive. **E–F)** Superficie interna della busta di plastica utilizzata per la conservazione, con evidente crescita di micelio fungino.

Per ampliare il recupero degli isolati fungini coltivabili associati al campione, i campioni sono stati inoculati su differenti terreni di coltura, selettivi e non selettivi, comprendenti Rose Bengal Agar (RB), Malt Extract Agar (MEA) e Sabouraud Agar (SAB), al fine di favorire l'isolamento del maggior numero possibile di microrganismi presenti sul materiale. Al termine dell'incubazione sono stati osservati numerosi morfotipi coloniali, distinguibili per colore, tessitura, pigmentazione, velocità di crescita e morfologia dei margini (**Figura 14**), successivamente selezionati e sottoposti a ripetuti passaggi di re-isolamento fino all'ottenimento di colture pure, costituite da colonie monospecifiche prive di contaminazioni, indispensabili per le successive analisi morfologiche e molecolari (**Figure 15A-15B**).



Figura 14. Piastre Petri di colture fungine madri (Ø 6 cm) ottenute dalla camicia di cotone su differenti terreni di coltura: Malt Extract Agar (MEA), Rose Bengal Agar (RB) e Sabouraud Agar (SAB).

ISOLATI PURI

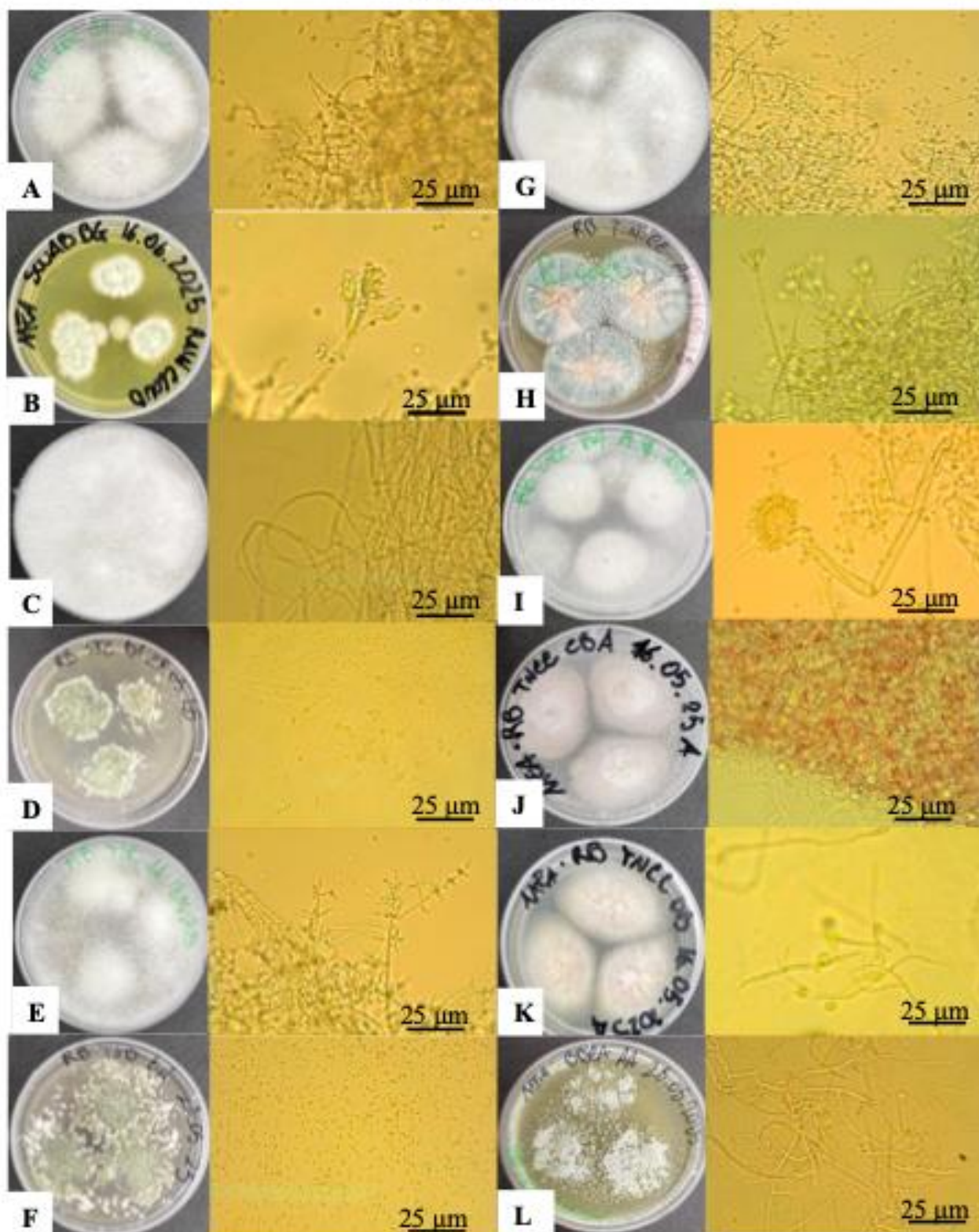


Figura 15A. Isolati fungini puri ottenuti dalla camicia di cotone, con relative osservazioni macro- e micro-morfologiche.

A) *Fusarium oxysporum*; B, H) *Penicillium citrinum*; C–I, K–L) *Trichoderma* spp.; J) isolato non identificato.

ISOLATI PURI

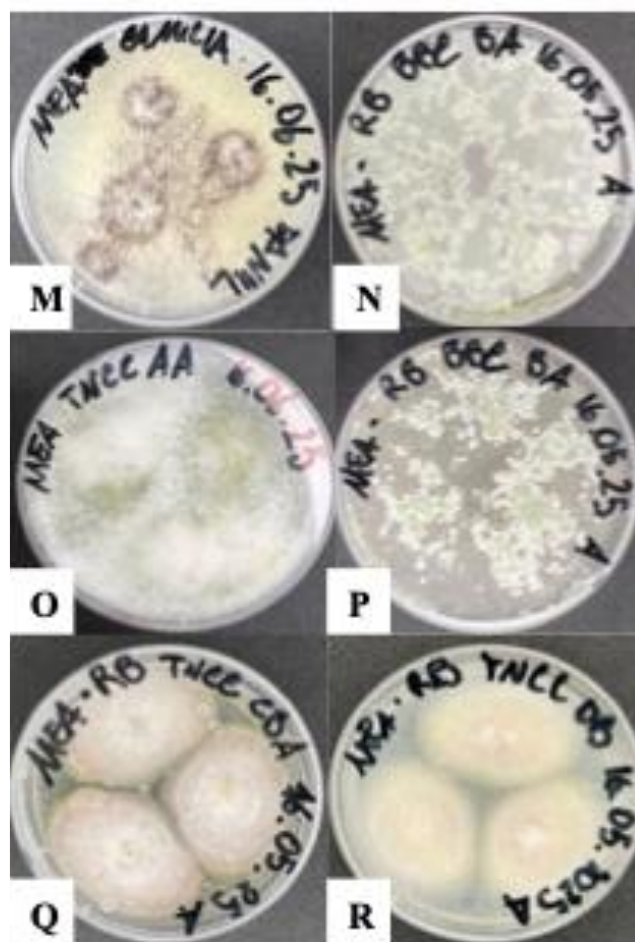


Figura 15B. Isolati fungini puri ottenuti dalla camicia di cotone. **M, Q-R)** *Humicola fuscoatra*; **N-P)** *Trichoderma spp.*

Complessivamente sono stati ottenuti 14 isolati fungini, riportati nella **Tabella IV**, successivamente sottoposti a estrazione del DNA, amplificazione della regione ITS e sequenziamento.

DNA code	Genere	Specie
029-E1	<i>Humicola</i>	<i>fuscoatra</i>
029-E2	N/A	-
029-E3	<i>Penicillium</i>	<i>citrinum</i>
029-E4	<i>Penicillium</i>	<i>citrinum</i>
029-E5	<i>Trichoderma</i>	<i>koningiopsis</i>
029-E6	<i>Trichoderma</i>	<i>longibrachiatum</i>
029-E7	<i>Trichoderma</i>	<i>longibrachiatum</i>
029-E8	<i>Trichoderma</i>	<i>longibrachiatum</i>

029-E9	<i>Trichoderma</i>	<i>koningii</i>
029-F1	<i>Trichoderma</i>	<i>longibrachiatum</i>
029-F2	<i>Trichoderma</i>	<i>erinaceum</i>
029-F3	<i>Trichoderma</i>	<i>koningii</i>
029-F4	<i>Fusarium</i>	<i>oxysporum</i>
029-F5	<i>Penicillium</i>	<i>citrinum</i>

Tabella IV. Elenco degli isolati fungini ottenuti dal campione della camicia di cotone, con identificazione tassonomica.

L'osservazione macro- e micromorfologica delle colture pure ha consentito una prima attribuzione tassonomica degli isolati recuperati dalla camicia, permettendo di riconoscere morfotipi riconducibili principalmente ai generi *Trichoderma*, *Penicillium*, *Humicola* e *Fusarium*. La successiva caratterizzazione molecolare, basata sul sequenziamento della regione ITS e sul confronto delle sequenze mediante BLAST, ha consentito di affinare tali attribuzioni e, per la maggior parte degli isolati, di proporre un'identificazione a livello di specie.

In particolare, gli isolati precedentemente attribuiti al genere *Trichoderma* sono risultati riconducibili a *Trichoderma koningiopsis* (029-E5), *T. longibrachiatum* (029-E6, 029-E7, 029-E8 e 029-F1), *T. erinaceum* (029-F2) e *T. koningii* (029-E9 e 029-F3). Per questi ultimi, il miglior match BLAST è risultato associato alla denominazione storica *Hypocrea koningii*, attualmente riconosciuta come *Trichoderma koningii*. Gli isolati appartenenti a *Trichoderma* sono stati recuperati da differenti porzioni del campione e dalla superficie interna della busta di plastica utilizzata per la conservazione, risultando complessivamente il gruppo maggiormente rappresentato. Gli isolati 029-E3, 029-E4 e 029-F5, inizialmente attribuiti morfologicamente al genere *Penicillium*, sono stati identificati mediante analisi molecolare come *Penicillium citrinum*, mentre l'isolato 029-F4, appartenente al genere *Fusarium*, ha mostrato come miglior corrispondenza *Fusarium oxysporum*. L'isolato 029-E1, morfologicamente attribuito al genere *Humicola*, ha mostrato come miglior match *Humicola fuscoatra*, con una percentuale di identità del 99,56%; la query cover pari all'80% impone tuttavia maggiore cautela nell'interpretazione dell'attribuzione a livello di specie. L'isolato 029-E2 non ha invece consentito di ottenere un'identificazione tassonomica conclusiva ed è stato pertanto mantenuto come non identificato.

La contemporanea identificazione di quattro differenti generi fungini e il recupero di quattordici isolati evidenziano, in conclusione, una composizione tassonomica fungina eterogenea sviluppatasi in seguito all'esposizione della camicia a differenti condizioni ambientali.

4.2 Cintura di cuoio

La cintura di cuoio ha rappresentato una matrice di particolare interesse micologico in quanto costituita da un materiale di origine animale prevalentemente collagenico, caratterizzato da proprietà chimico-fisiche differenti rispetto ai materiali tessili naturali e sintetici analizzati nel presente studio. Il campione proveniva da un'abitazione privata, dove era stato conservato per un periodo prolungato all'interno di un armadio, in normali condizioni domestiche, con temperature variabili in funzione della stagionalità, comprese mediamente tra 18 ± 1 °C nel periodo invernale e valori generalmente non superiori a 32 °C durante il periodo estivo prima del campionamento. L'osservazione macroscopica del campione ha evidenziato diffuse alterazioni superficiali compatibili con fenomeni di colonizzazione biologica, caratterizzate dalla presenza di alterazioni cromatiche biancastre e grigiastre distribuite in maniera irregolare lungo il manufatto, con perdita dell'omogeneità della finitura superficiale (**Figura 16**). Le alterazioni risultavano maggiormente concentrate nella porzione centrale della cintura e in prossimità dei fori di regolazione, dove erano presenti depositi superficiali compatibili con fenomeni di colonizzazione biologica. Nel complesso, il campione mostrava una marcata eterogeneità cromatica e un'evidente alterazione dell'aspetto superficiale.



Figura 16. Aspetto macroscopico della cintura di cuoio con evidenti alterazioni superficiali associate alla colonizzazione fungina. **A)** Visione d'insieme della cintura. **B–C)** Dettagli delle aree interessate dalla colonizzazione e dalle alterazioni superficiali.

L'osservazione allo stereomicroscopio ha consentito di approfondire le alterazioni evidenziate macroscopicamente, mettendo in evidenza abbondante materiale filamentoso aderente alla superficie del cuoio, prevalentemente lungo le irregolarità del substrato e nelle aree maggiormente alterate (**Figura 17**). Le strutture osservate apparivano strettamente associate alla superficie del materiale, indicando un processo di colonizzazione superficiale già consolidato. L'analisi allo stereomicroscopio ha inoltre consentito di individuare le aree maggiormente rappresentative da sottoporre al successivo campionamento microbiologico.



Figura 17. Immagini acquisite allo stereomicroscopio della sezione trasversale della cintura di cuoio. **A)** Visione d'insieme della colonizzazione fungina. **B–C)** Dettagli del micelio associato al materiale.

I campioni prelevati sono stati inoculati su differenti terreni di coltura, selettivi e non selettivi, al fine di ampliare il recupero degli isolati fungini coltivabili associati al campione. Al termine dell'incubazione sono stati osservati differenti morfotipi coloniali, distinguibili per pigmentazione, tessitura, morfologia dei margini e velocità di crescita. Le colonie sviluppatesi sulle piastre madri hanno evidenziato caratteristiche macroscopiche differenti, consentendo la selezione dei morfotipi maggiormente rappresentativi e il loro successivo trasferimento su nuovi terreni di coltura per l'ottenimento delle colture pure (**Figure 18-19**).

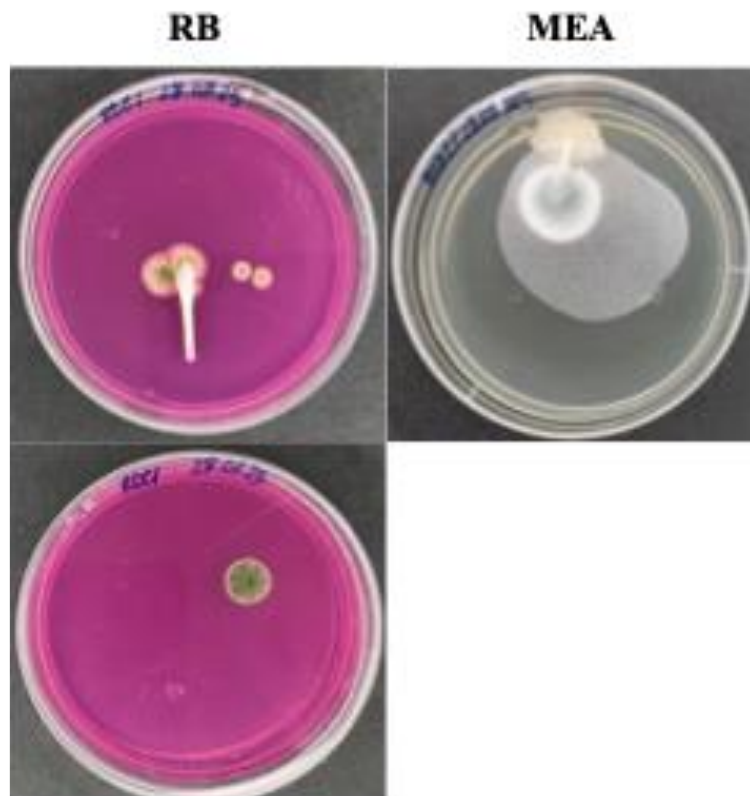


Figura 18. Piastre Petri di colture fungine madri (Ø 6 cm) ottenute dalla cintura di cuoio su due differenti terreni di coltura: Rose Bengal Agar (RB) e Malt Extract Agar (MEA).

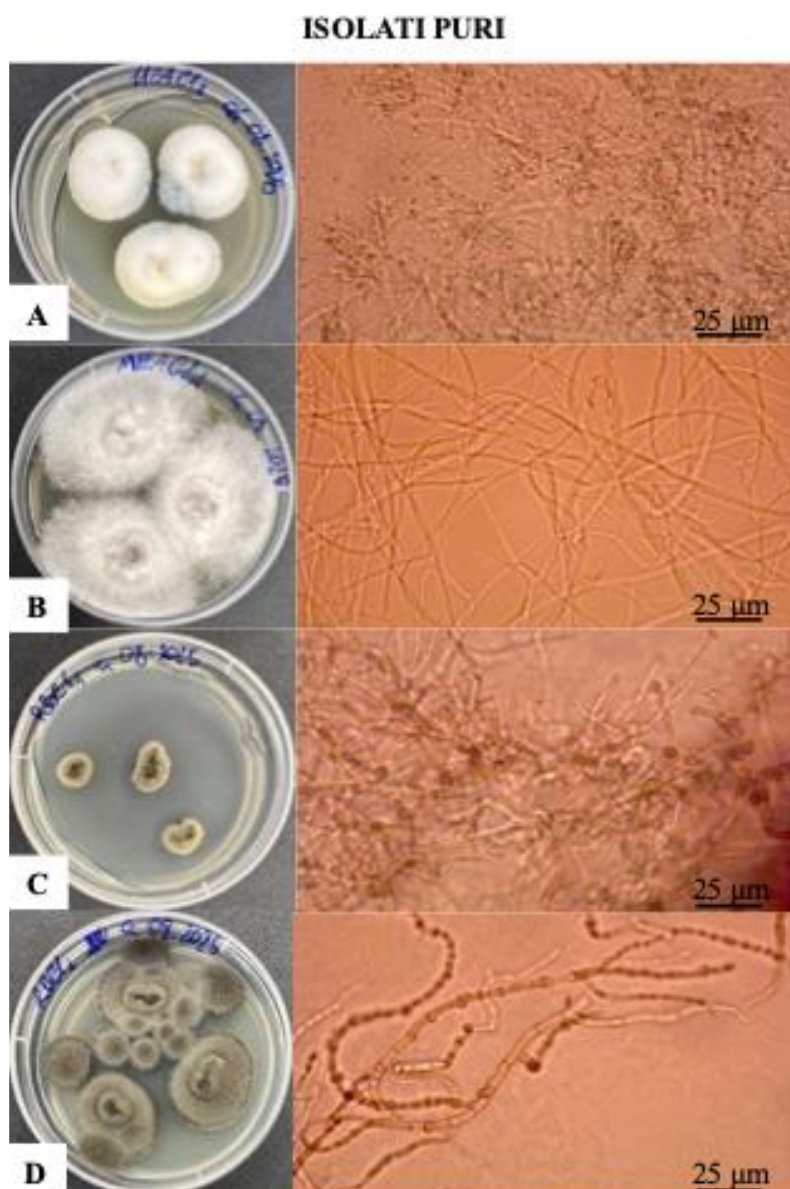


Figura 19. Isolati fungini puri ottenuti dalla cintura di cuoio e coltivati in piastre Petri (Ø 6 cm), con relative osservazioni macro- e micromorfologiche. **A)** *Cladosporium halotolerans*; **B)** *Alternaria infectoria* (*Lewia infectoria*); **C)** *Penicillium dipodomyicola*; **D)** *Cladosporium eucommiae*.

Le colonie selezionate sono state successivamente reisolate mediante ripetuti passaggi colturali fino all'ottenimento di colture pure, costituite da popolazioni fungine monospecifiche prive di contaminazioni, indispensabili per le successive analisi morfologiche e molecolari. Le colture pure sono state ottenute e mantenute sui terreni Rose Bengal Agar (RB) e Malt Extract Agar (MEA) e utilizzate per l'estrazione del DNA e le successive analisi molecolari. Complessivamente sono stati ottenuti quattro isolati fungini, riportati nella **Tabella V**, sottoposti a estrazione del DNA e ad amplificazione della regione ITS del DNA ribosomiale.

DNA code	Genere	Specie
030-E7	<i>Cladosporium</i>	<i>halotorelans</i>
030-E8	<i>Alternaria</i>	<i>infectoria</i>
030-E9	<i>Penicillium</i>	<i>dipodomycola</i>
030-F1	<i>Cladosporium</i>	<i>eucommiae</i>

Tabella V. Elenco degli isolati fungini ottenuti dal campione della cintura di cuoio, con identificazione tassonomica.

L'osservazione macro- e micromorfologica delle colture pure ha consentito una prima attribuzione tassonomica degli isolati recuperati dalla cintura di cuoio, permettendo di riconoscere morfotipi riconducibili ai generi *Cladosporium*, *Alternaria* e *Penicillium*. La successiva caratterizzazione molecolare, basata sul sequenziamento della regione ITS e sul confronto delle sequenze mediante BLAST, ha consentito di affinare tali attribuzioni e di proporre un'identificazione a livello di specie per tutti e quattro gli isolati. In particolare, i due isolati morfologicamente attribuiti al genere *Cladosporium* hanno mostrato come migliori corrispondenze molecolari *Cladosporium halotolerans* (030-E7) e *Cladosporium eucommiae* (030-F1). Per l'isolato 030-E7, tuttavia, l'elevata percentuale di identità (99,66%) è associata a una query cover pari al 65%; l'attribuzione a *C. halotolerans* deve pertanto essere interpretata con maggiore cautela e considerata congiuntamente alle caratteristiche macro- e micromorfologiche osservate. Al contrario, l'isolato 030-F1 ha mostrato una query cover del 100% e un'identità del 100% con la sequenza di riferimento di *C. eucommiae*. L'isolato 030-E8, inizialmente attribuito morfologicamente al genere *Alternaria*, ha mostrato come miglior match BLAST *Lewia infectoria*, denominazione storicamente associata al taxon attualmente riconosciuto come *Alternaria infectoria*, con query cover del 100% e identità del 99,79%. Infine, l'isolato 030-E9, morfologicamente attribuito al genere *Penicillium*, è risultato riconducibile a *Penicillium dipodomycola*, con query cover del 100% e identità del 99,46%. Nel complesso, l'integrazione tra caratterizzazione macro- e micromorfologica e analisi molecolare ha consentito di affinare la risoluzione tassonomica dei quattro isolati recuperati dalla cintura di cuoio, passando dalla preliminare attribuzione a livello di genere a identificazioni molecolari a livello di specie. I risultati sono stati interpretati considerando congiuntamente i parametri restituiti dal BLAST e la coerenza con le osservazioni morfologiche, con particolare cautela nel caso di *C. halotolerans* a causa della ridotta copertura della sequenza.

Sebbene il numero di isolati recuperati sia risultato inferiore rispetto a quello osservato negli altri materiali analizzati, i risultati confermano come anche un manufatto in cuoio, nonostante il processo di concia e la maggiore resistenza al biodeterioramento rispetto ad altre matrici organiche, possa

ospitare un insieme eterogeneo di isolati fungini in seguito a una prolungata permanenza del campione in ambiente confinato.

4.3 Tessuto copridivano sintetico

Il tessuto sintetico di rivestimento (copridivano) rappresenta una matrice di particolare interesse micologico poiché, pur non essendo generalmente meno suscettibile alla biodegradazione diretta ai materiali organici, può favorire l'insediamento di comunità fungine grazie all'accumulo di polvere, residui organici e umidità sulla superficie delle fibre. Il campione analizzato proveniva da una cantina privata caratterizzata da elevata umidità relativa, ridotta ventilazione e limitata esposizione alla luce, condizioni favorevoli allo sviluppo dei funghi filamentosi. Dal punto di vista macroscopico, il campione presentava numerose alterazioni superficiali caratterizzate dalla presenza di punti pigmentati di colore bruno-nerastro distribuiti irregolarmente sull'intera superficie del tessuto, con maggiore concentrazione lungo la trama e nelle aree interessate da accumulo di particolato (**Figura 20**). L'osservazione allo stereomicroscopio ha evidenziato numerosi aggregati fungini localizzati prevalentemente negli spazi interstiziali delle fibre sintetiche, suggerendo una colonizzazione diffusa del materiale (**Figura 21**).



Figura 20. Aspetto macroscopico del tessuto di rivestimento sintetico (copridivano) prelevato da un ambiente di cantina. **A–B)** Dettagli della superficie del tessuto con alterazioni cromatiche e segni di colonizzazione fungina osservati da differenti prospettive.

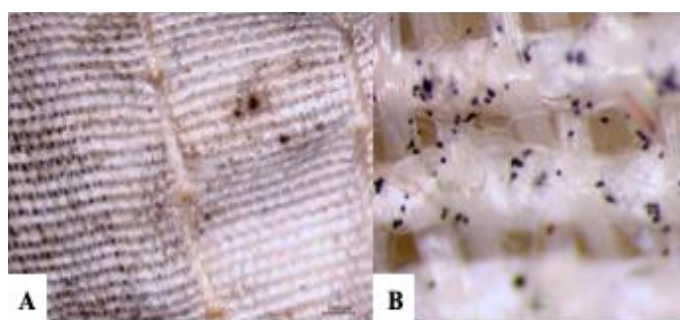


Figura 21. Immagini acquisite allo stereomicroscopio del tessuto di rivestimento sintetico (copridivano). **A)** Visione d'insieme della colonizzazione fungina sulla superficie del tessuto. **B)** Dettaglio del micelio associato alle fibre sintetiche.

Per ampliare il recupero degli isolati fungini coltivabili associati al campione, il campione è stato inoculato su differenti terreni di coltura, selettivi e non selettivi, comprendenti Malt Extract Agar (MEA), Potato Dextrose Agar (PDA), Rose Bengal Agar (RB), Sabouraud Agar (SAB), Blood Liver Agar (BLA) e Malt Liver Agar (MLA). Al termine dell'incubazione sono stati osservati due differenti morfotipi coloniali, distinti per caratteristiche macroscopiche, velocità di crescita e morfologia delle

colonie, successivamente sottoposti a ripetuti passaggi di reisolamento fino all'ottenimento di colture pure (**Figura 22**). Gli isolati ottenuti (**Figura 23**) sono stati codificati come TP2, TME1 e RBHT2-1, come riportato nella **Tabella VI**, e sono stati sottoposti a caratterizzazione morfologica, estrazione del DNA e successiva analisi molecolare della regione ITS.

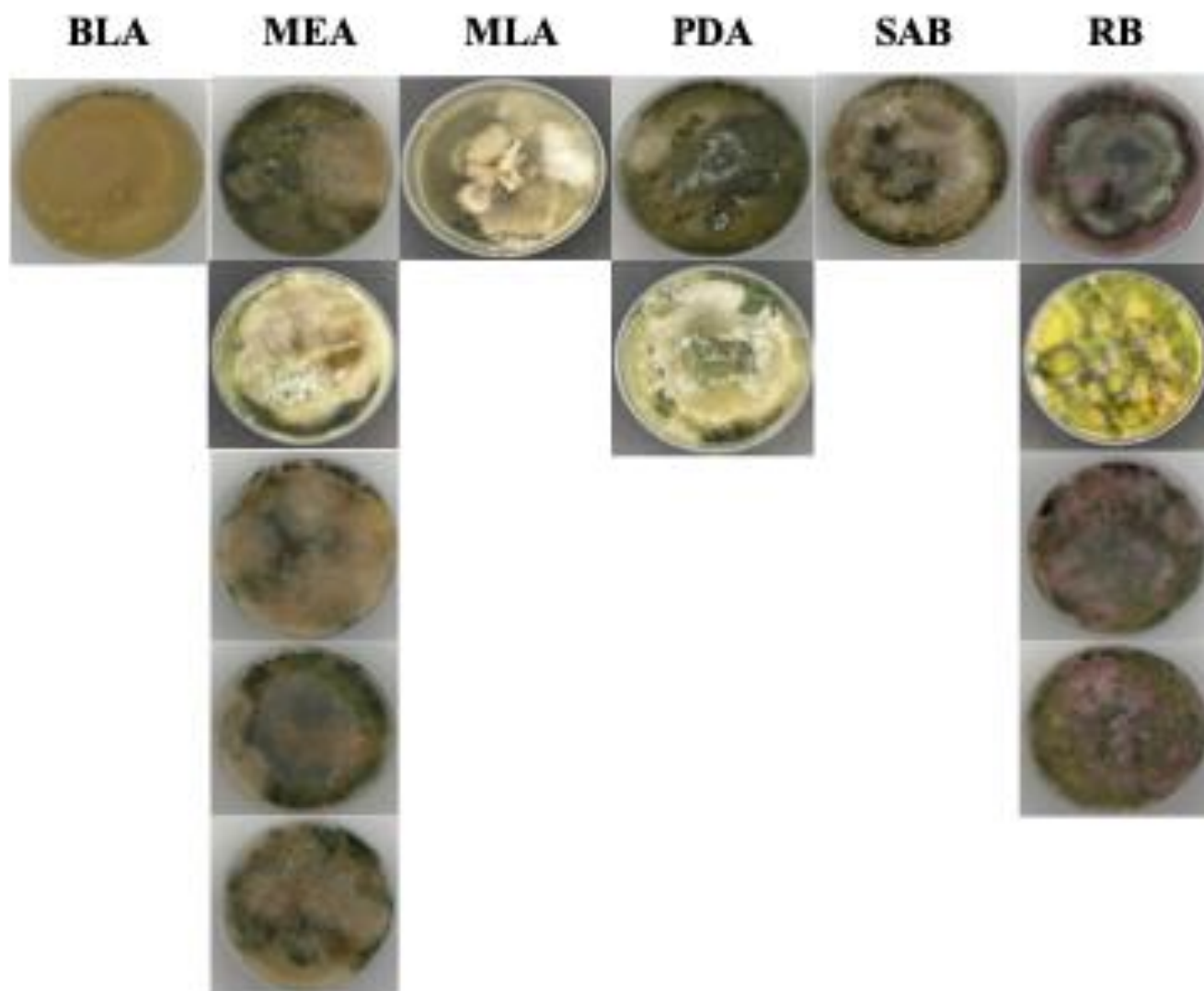


Figura 22. Piastre Petri di colture fungine madri (Ø 6 cm) ottenute dal tessuto di rivestimento sintetico (copridivano) su differenti terreni di coltura: Blood Liver Agar (BLA), Malt Extract Agar (MEA), Malt Liver Agar (MLA), Potato Dextrose Agar (PDA), Sabouraud Agar (SAB) e Rose Bengal Agar (RB).

ISOLATI PURI

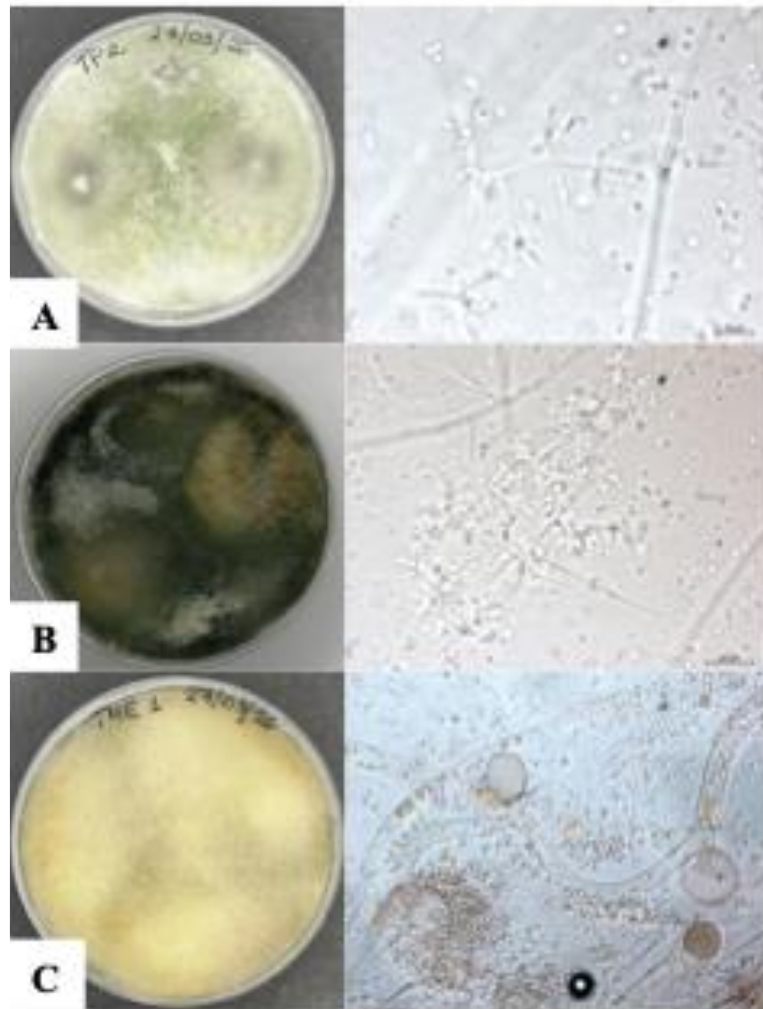


Figura 23. Isolati fungini puri ottenuti dal tessuto di rivestimento sintetico (copridivano) e coltivati in piastre Petri (Ø 6 cm), con relative osservazioni macroscopiche e microscopiche. **A–B)** *Trichoderma harzianum*. **C)** *Mucor circinelloides*.

DNA code	Genere	Specie
033-G2	<i>Trichoderma</i>	<i>harzianum</i>
033-G3	<i>Mucor</i>	<i>circinelloides</i>
033-G4	<i>Trichoderma</i>	<i>harzianum</i>

Tabella VI. Elenco degli isolati fungini ottenuti dal tessuto di rivestimento sintetico (copridivano), con identificazione tassonomica.

L'osservazione macro- e micromorfologica delle colture pure ha consentito una prima attribuzione tassonomica degli isolati recuperati dal copridivano ai generi *Trichoderma* e *Mucor*. La successiva caratterizzazione molecolare, basata sul sequenziamento della regione ITS e sul confronto delle sequenze mediante BLAST, ha permesso di affinare l'identificazione fino al livello di specie. In

particolare, gli isolati 033-G2 e 033-G4 sono stati identificati come *Trichoderma harzianum*, con query cover del 100% e percentuali di identità rispettivamente del 99,88% e del 99,77%, mentre l'isolato 033-G3 è stato identificato come *Mucor circinelloides*, con query cover del 100% e identità del 99,77%. Nel complesso, l'integrazione tra caratterizzazione macro- e micromorfologica e analisi molecolare ha consentito di identificare i tre isolati recuperati dal copridivano come *T. harzianum* e *M. circinelloides*.

Il loro recupero da un materiale sintetico documenta la colonizzazione fungina della superficie del campione, potenzialmente favorita dall'accumulo di residui organici e dalle condizioni microambientali della cantina. Tale evidenza non costituisce, tuttavia, una dimostrazione della biodegradazione diretta delle fibre sintetiche, aspetto che richiederebbe specifiche analisi del materiale.

4.4 Ombrellone di fibre sintetiche

L'ombrellone in fibre sintetiche ha rappresentato una matrice di particolare interesse micologico in quanto costituito da un materiale polimerico destinato all'impiego in ambiente esterno e costantemente esposto agli agenti atmosferici. Sebbene le fibre sintetiche non costituiscano generalmente una fonte nutritiva diretta per i microrganismi fungini, la loro esposizione prolungata all'ambiente favorisce l'accumulo di polvere, residui organici, particolato atmosferico e umidità, creando condizioni idonee all'adesione delle spore e allo sviluppo di comunità fungine superficiali. Per tali caratteristiche, questo materiale rappresenta un modello di interesse per lo studio della colonizzazione fungina di manufatti sintetici esposti all'ambiente.

I campioni prelevati dall'ombrellone sono stati inoculati su differenti terreni di coltura, selettivi e non selettivi, al fine di massimizzare il recupero della biodiversità fungina associata al campione. Al termine dell'incubazione sono stati osservati differenti morfotipi coloniali, distinguibili per pigmentazione, tessitura, morfologia e velocità di crescita. Le colonie sviluppatesi sulle piastre madri hanno evidenziato caratteristiche macroscopiche differenti, consentendo la selezione dei morfotipi maggiormente rappresentativi e il loro successivo trasferimento su nuovi terreni di coltura per l'ottenimento delle colture pure (**Figura 24**).

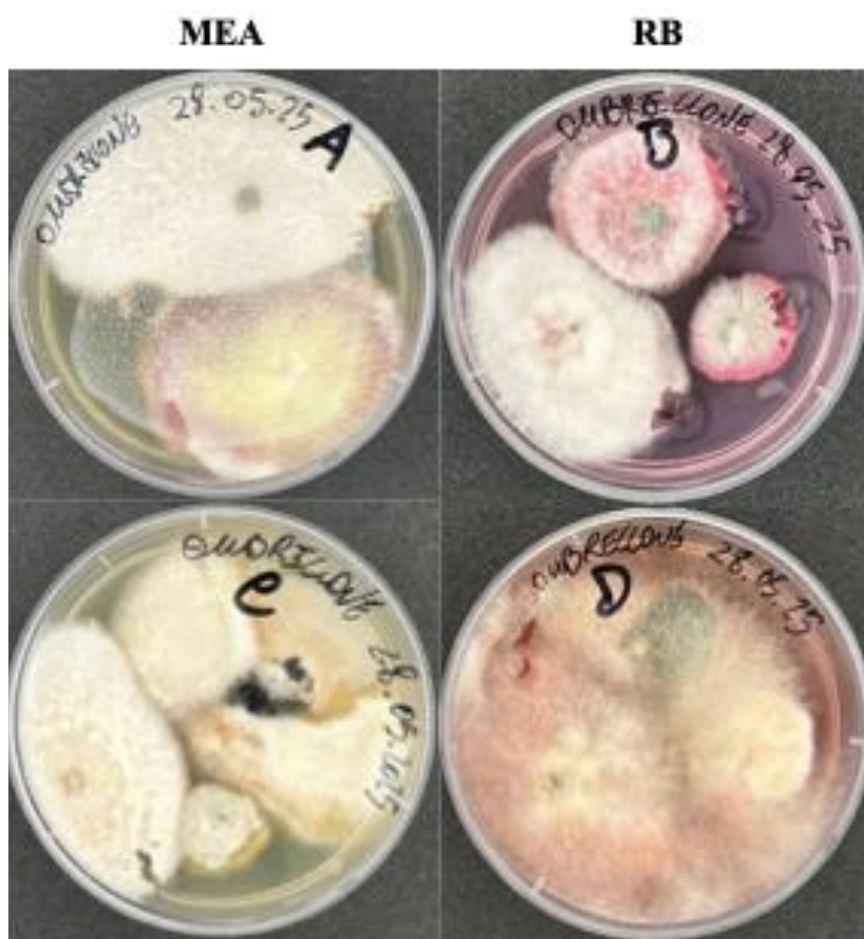


Figura 24. Piastre Petri di colture fungine madri (Ø 6 cm) ottenute dal tessuto sintetico dell'ombrellone su due differenti terreni di coltura: Malt Extract Agar (MEA) e Rose Bengal Agar (RB).

Le colture pure sono state ottenute e mantenute su Malt Extract Agar (MEA), come riportato nella **Tabella VII**, e successivamente utilizzate per l'estrazione del DNA e le analisi molecolari (**Figure 25A-25B**).

ISOLATI PURI

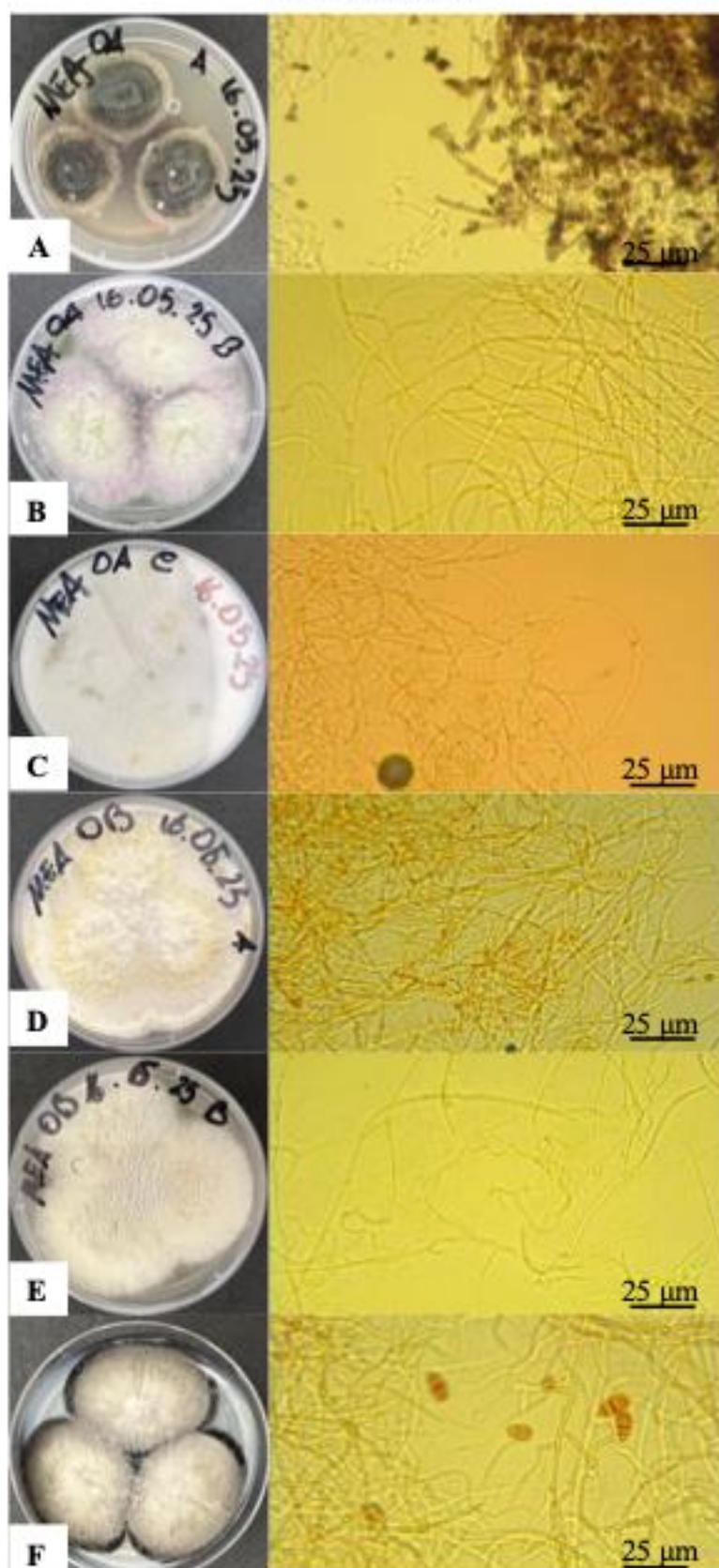


Figura 25A. Isolati fungini puri ottenuti dal tessuto sintetico dell'ombrellone e coltivati in piastre Petri (Ø 6 cm), con relative osservazioni macro- e micromorfologiche. **A)** *Stachybotrys chlorohalonatus*; **B)** *Fusarium acuminatum*; **C–E)** *Pestalotiopsis maculiformans*; **F)** *Curvularia pseudolunata*.

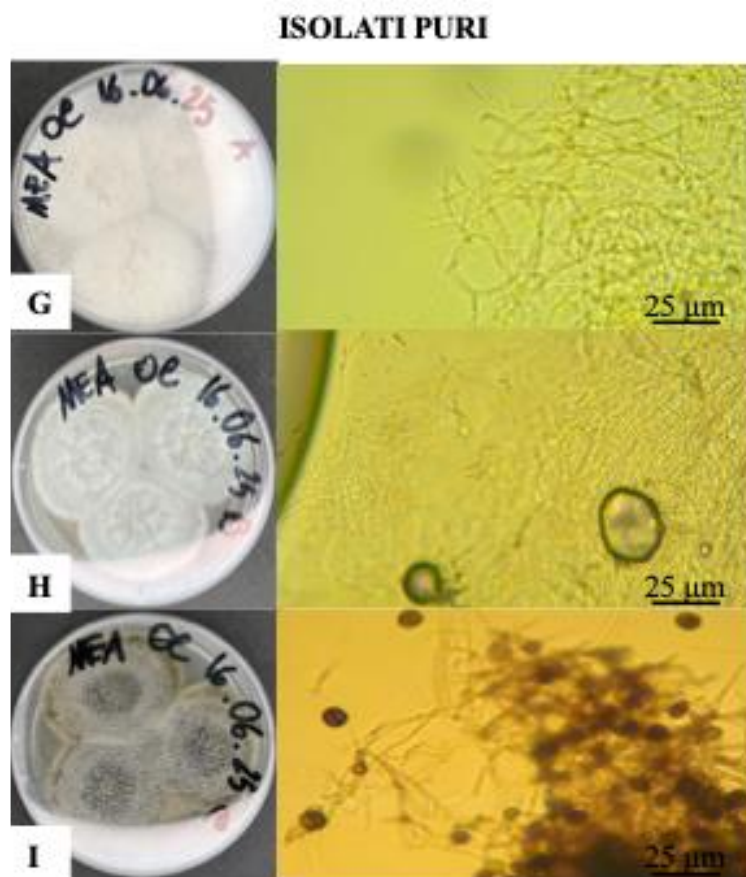


Figura 25B. Isolati fungini puri ottenuti dal tessuto sintetico dell’ombrellone e coltivati in piastre Petri (Ø 6 cm), con relative osservazioni macro- e micromorfologiche. **G)** *Pestalotiopsis maculiformans*; **H)** *Penicillium elantae*; **I)** *Alternaria brassicae*.

Complessivamente sono stati ottenuti nove isolati fungini, riportati nella **Tabella VII**, per i quali è stata effettuata l’estrazione del DNA e l’amplificazione della regione ITS.

DNA code	Genere	Specie
029-F6	<i>Stachybotrys</i>	<i>chlorohalonatus</i>
029-F7	<i>Fusarium</i>	<i>acuminatum</i>
029-F8	<i>Pestalotiopsis</i>	<i>maculiformans</i>
029-F9	<i>Pestalotiopsis</i>	<i>maculiformans</i>
029-G1	<i>Pestalotiopsis</i>	<i>maculiformans</i>
029-G2	<i>Curvularia</i>	<i>pseudolunata</i>
029-G3	<i>Pestalotiopsis</i>	<i>maculiformans</i>
029-G4	<i>Penicillium</i>	<i>elantae</i>
029-G5	<i>Alternaria</i>	<i>brassicae</i>

Tabella VII. Elenco degli isolati fungini ottenuti dal tessuto sintetico dell’ombrellone, con identificazione tassonomica.

L'osservazione macro- e micromorfologica delle colture pure ha consentito una prima attribuzione tassonomica degli isolati recuperati dall'ombrellone, permettendo di riconoscere morfotipi riconducibili ai generi *Stachybotrys*, *Fusarium*, *Curvularia*, *Penicillium* e *Alternaria*, mentre quattro isolati erano stati inizialmente attribuiti alla classe Sordariomycetes. La successiva caratterizzazione molecolare, basata sul sequenziamento della regione ITS e sul confronto delle sequenze mediante BLAST, ha consentito di affinare tali attribuzioni e di proporre un'identificazione a livello di specie per tutti gli isolati analizzati.

In particolare, gli isolati 029-F6 e 029-F7 hanno mostrato come migliori corrispondenze rispettivamente *Stachybotrys chlorohalonatus* e *Fusarium acuminatum*. I quattro isolati precedentemente attribuiti alla classe Sordariomycetes (029-F8, 029-F9, 029-G1 e 029-G3) hanno mostrato come miglior match *Pestalotiopsis maculiformans*, con query cover del 100% e percentuali di identità comprese tra 98,02% e 98,56%, consentendo di ottenere una risoluzione tassonomica maggiore rispetto alla precedente attribuzione a livello di classe. Gli isolati 029-G4 e 029-G5 sono stati invece identificati rispettivamente come *Penicillium elantae* e *Alternaria brassicae*, con query cover del 100% e percentuali di identità pari rispettivamente al 98,63% e al 98,50%. Per l'isolato 029-G2, morfologicamente attribuito al genere *Curvularia*, il miglior match BLAST è risultato *Curvularia pseudolunata*, con query cover del 100% ma una percentuale di identità pari al 96,88%. Tale valore, inferiore rispetto a quello osservato per gli altri isolati e alla soglia del 97% adottata come riferimento nel presente studio, richiede maggiore cautela nell'attribuzione a livello di specie; il risultato è stato pertanto mantenuto come migliore corrispondenza molecolare disponibile e interpretato congiuntamente alle evidenze morfologiche. Nel complesso, l'integrazione tra caratterizzazione macro- e micromorfologica e analisi molecolare ha consentito di ottenere una definizione tassonomica più dettagliata degli isolati recuperati dall'ombrellone. Tra i reperti analizzati, questo campione ha mostrato la maggiore eterogeneità tassonomica degli isolati fungini recuperati. La presenza di taxa differenti su un materiale sintetico esposto prolungatamente all'ambiente esterno evidenzia come tali superfici possano essere colonizzate da una componente fungina diversificata, potenzialmente influenzata dalle condizioni microambientali, dall'esposizione agli agenti atmosferici e dalla presenza di materiale organico depositato sulla superficie.

Dal punto di vista forense, tali risultati evidenziano il potenziale interesse dell'analisi micologica applicata ai manufatti sintetici esposti all'esterno, poiché la composizione della comunità fungina può fornire informazioni indirette sulle condizioni di esposizione e sul microambiente di permanenza del campione.

Il ruolo ecologico dei taxa identificati, il loro coinvolgimento nei processi di biodeterioramento delle fibre sintetiche e le relative implicazioni in ambito forense saranno approfonditi nella sezione dedicata

alla discussione. L'analisi micologica condotta sui quattro campioni ha evidenziato come la natura del substrato e le differenti condizioni di esposizione e conservazione sembrano aver influenzato significativamente la composizione delle comunità fungine isolate. Complessivamente sono stati identificati numerosi taxa appartenenti a differenti gruppi ecologici, distribuiti in maniera eterogenea tra la camicia di cotone, la cintura di cuoio, il tessuto sintetico del copridivano e l'ombrellone in fibre sintetiche.

Le differenze osservate suggeriscono, quindi, che la colonizzazione fungina non dipenda esclusivamente dalla composizione chimico-fisica del materiale, ma sia il risultato dell'interazione tra le caratteristiche del substrato, il microambiente di esposizione e la disponibilità di nutrienti. Nel presente capitolo i risultati ottenuti verranno discussi alla luce della letteratura scientifica disponibile, analizzando il ruolo ecologico dei taxa identificati, i meccanismi di colonizzazione e biodeterioramento delle diverse matrici e le possibili implicazioni in ambito forense.

4.5 Analisi della diversità degli isolati fungini

L'analisi della diversità degli isolati fungini recuperati dai quattro campioni ha evidenziato differenze sia nella ricchezza tassonomica osservata sia nella distribuzione relativa degli isolati tra i differenti taxa.

Ai fini del confronto tra i campioni, gli isolati sono stati raggruppati a livello di genere, indipendentemente dall'eventuale identificazione molecolare raggiunta a livello di specie, in modo da mantenere un livello tassonomico operativo uniforme.

I risultati ottenuti mediante gli indici di Shannon (H') e Simpson ($1-D$) sono riportati nella **Tabella VIII** e rappresentati graficamente nel Grafico I. Tali indici forniscono informazioni complementari sulla struttura degli isolati recuperati, poiché tengono conto, con differente sensibilità, sia del numero di taxa sia della loro distribuzione relativa (Lozupone & Knight, 2008; Morris et al., 2014).

Per la camicia di cotone sono stati ottenuti complessivamente 14 isolati fungini, dei quali 13 hanno ricevuto un'attribuzione tassonomica e sono stati pertanto inclusi nel calcolo degli indici. Gli isolati considerati erano distribuiti tra quattro generi: *Trichoderma* era il gruppo maggiormente rappresentato, con otto isolati, seguito da *Penicillium* con tre isolati, mentre *Humicola* e *Fusarium* erano rappresentati da un isolato ciascuno. Le differenti specie identificate all'interno di *Trichoderma*, comprendenti *T. koningiopsis*, *T. longibrachiatum*, *T. erinaceum* e *T. koningii*, sono state considerate come un'unica categoria tassonomica ai fini del calcolo. Analogamente, gli isolati identificati come *Penicillium citrinum* sono stati inclusi nel genere *Penicillium*. La ricchezza osservata è risultata pari a $S = 4$, mentre gli indici hanno assunto valori di $H' = 1,032$ e $1-D = 0,556$ (**Tabella VIII**). La predominanza di *Trichoderma* ha determinato una distribuzione poco uniforme

tra i quattro taxa, contribuendo a contenere i valori degli indici nonostante la ricchezza tassonomica osservata.

Per la cintura di cuoio sono stati considerati quattro isolati distribuiti tra tre generi: due isolati di *Cladosporium*, un isolato appartenente al genere *Penicillium* e uno appartenente al genere *Alternaria*. La ricchezza osservata è risultata pari a $S = 3$, con $H' = 1,040$ e $1-D = 0,625$ (**Tabella VIII**). Nonostante la cintura presentasse una ricchezza inferiore rispetto alla camicia, entrambi gli indici hanno assunto valori leggermente superiori. Tale risultato è riconducibile alla maggiore uniformità nella distribuzione degli isolati: il genere maggiormente rappresentato, *Cladosporium*, comprendeva infatti due dei quattro isolati, mentre *Penicillium* e *Alternaria* erano rappresentati da un isolato ciascuno. Questo andamento evidenzia come il valore degli indici di diversità non dipenda esclusivamente dalla ricchezza tassonomica, ma anche dalla distribuzione relativa degli isolati tra i taxa (Lozupone & Knight, 2008; Morris et al., 2014).

Il copridivano sintetico ha mostrato i valori più bassi tra i campioni analizzati. I tre isolati erano distribuiti tra due generi, con due isolati identificati come appartenenti al genere *Trichoderma* e uno come appartenente al genere *Mucor*. La ricchezza osservata è risultata quindi pari a $S = 2$, mentre H' e $1-D$ hanno assunto valori rispettivamente di 0,637 e 0,444 (**Tabella VIII**). Il risultato riflette contemporaneamente la ridotta ricchezza tassonomica e la predominanza di *Trichoderma*, rappresentato da due dei tre isolati.

L'ombrellone ha presentato la maggiore ricchezza tassonomica osservata, con nove isolati distribuiti tra sei generi. Quattro isolati sono stati identificati come appartenenti al genere *Pestalotiopsis* mentre i restanti cinque isolati appartenevano ai generi *Stachybotrys*, *Fusarium*, *Curvularia*, *Penicillium* e *Alternaria*, ciascuno rappresentato da un singolo isolato. La ricchezza osservata è risultata quindi pari a $S = 6$ e gli indici hanno raggiunto i valori più elevati tra i campioni analizzati, con $H' = 1,581$ e $1-D = 0,741$ (**Tabella VIII**). Sebbene *Pestalotiopsis* costituisse il genere maggiormente rappresentato, con quattro isolati, la presenza di altri cinque generi rappresentati ciascuno da un isolato ha determinato una maggiore eterogeneità complessiva rispetto agli altri campioni.

Il confronto complessivo dei valori, visualizzato nel **Grafico I**, evidenzia quindi i valori più elevati di entrambi gli indici nell'ombrellone e quelli più bassi nel copridivano, mentre camicia e cintura occupano una posizione intermedia. Particolarmente indicativo è il confronto tra questi ultimi due campioni: nonostante la camicia presenti una ricchezza osservata maggiore ($S = 4$ rispetto a $S = 3$), la cintura mostra valori leggermente superiori sia di Shannon sia di Simpson. Tale differenza deriva dalla maggiore uniformità nella distribuzione degli isolati della cintura rispetto alla marcata predominanza di *Trichoderma* nella camicia. Il risultato evidenzia l'utilità dell'impiego congiunto di differenti misure di diversità, che attribuiscono un peso diverso alla ricchezza e alla distribuzione

relativa dei taxa e non devono pertanto essere considerate completamente intercambiabili (Morris et al., 2014). La caratterizzazione quantitativa delle comunità microbiche attraverso la combinazione di ricchezza e distribuzione relativa dei taxa è inoltre ampiamente utilizzata negli studi di diversità microbica (Li et al., 2012).

Campione	Isolati identificati (N)	Ricchezza osservata (S)	Shannon (H')	Simpson (1-D)
Camicia	13	4	1,032	0,556
Cintura	4	3	1,040	0,625
Copridivano	3	2	0,637	0,444
Ombrellone	9	6	1,581	0,741

Tabella VIII. Indici di diversità di Shannon (H') e Simpson (1-D) calcolati sugli isolati fungini identificati nei quattro campioni analizzati.

La rappresentazione grafica dei risultati (**Grafico I**) rende immediatamente visibile la diversa distribuzione dei valori nei quattro campioni e, in particolare, la mancata corrispondenza necessaria tra maggiore ricchezza osservata e maggiore valore degli indici di diversità.

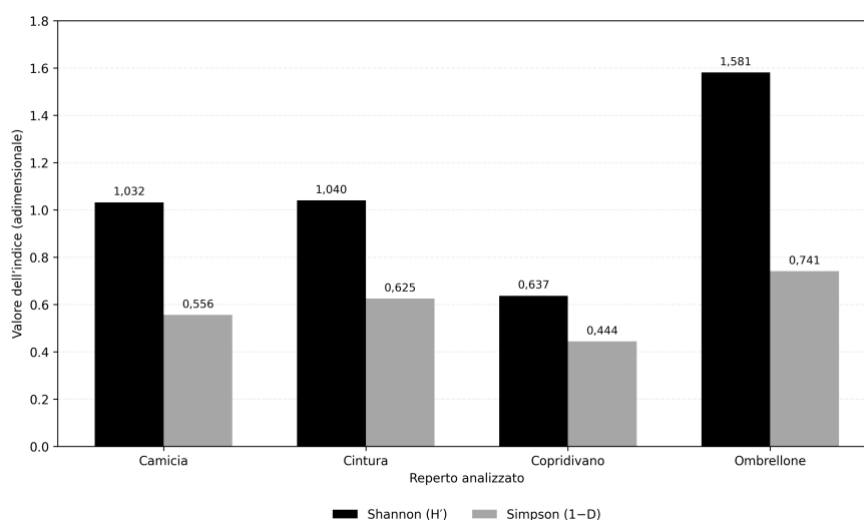


Grafico I. Rappresentazione degli indici di diversità di Shannon (H') e Simpson (1-D) calcolati sugli isolati fungini identificati nei quattro campioni analizzati.

L'interpretazione comparativa dei valori di ricchezza osservata e degli indici di Shannon e Simpson richiede cautela perché tali misure possano essere influenzate dalla dimensione e dalla completezza del campionamento. Nel presente studio, il numero e la distribuzione dei punti di prelievo sono stati adattati alle caratteristiche dei singoli campioni e non sono stati uniformi; le differenze osservate tra

i materiali possono pertanto riflettere, almeno in parte, anche le modalità di campionamento adottate e non esclusivamente la struttura ecologica della componente fungina associata ai reperti.

Un ulteriore limite deriva dalla natura *culture-dependent* dell'analisi. I valori ottenuti descrivono esclusivamente gli isolati fungini effettivamente prelevati, capaci di svilupparsi nelle condizioni colturali utilizzate, successivamente isolati e identificati. Essi non rappresentano quindi l'intera comunità fungina originariamente presente sui campioni, poiché gli approcci basati sulla coltivazione possono selezionare soltanto una parte della diversità microbica, mentre metodiche indipendenti dalle colture consentono di rilevare una componente più ampia della comunità presente (Li et al., 2012). Per questo motivo, i valori riportati nella **Tabella VIII** e nel **Grafico I** devono essere considerati misure descrittive ed esplorative della struttura degli isolati fungini coltivabili recuperati e non stime esaustive della biodiversità fungina reale dei quattro campioni.

Deve inoltre essere considerata la risoluzione tassonomica raggiunta per i diversi isolati. Le categorie utilizzate per il calcolo rappresentano infatti taxa operativi definiti sulla base dell'identificazione effettivamente disponibile. La scelta del livello tassonomico può influenzare la rappresentazione quantitativa, la diversità e deve pertanto essere considerata nell'interpretazione dei risultati (Lozupone & Knight, 2008).

I valori riportati nella **Tabella VIII** e nel **Grafico I** devono quindi essere interpretati esclusivamente in senso descrittivo ed esplorativo. Essi consentono di confrontare la struttura e la distribuzione relativa degli isolati fungini recuperati nei quattro campioni, ma non possono essere considerati una misura esaustiva della biodiversità fungina reale dei reperti né utilizzati per formulare inferenze dirette sulle comunità fungine degli ambienti di provenienza.

4.6 Discussione dei taxa fungini identificati

L'identificazione dei taxa fungini isolati dai diversi campioni ha evidenziato la presenza di organismi caratterizzati da differenti strategie ecologiche, capacità metaboliche e potenziale biodeteriogeno. La loro distribuzione deve tuttavia essere interpretata considerando l'interazione tra caratteristiche del substrato, condizioni microambientali e disponibilità di risorse nutritive, evitando di attribuire automaticamente le alterazioni osservate all'attività di un singolo microrganismo.

La discussione è stata pertanto organizzata secondo i principali generi e taxa identificati, approfondendone le caratteristiche ecologiche e metaboliche in relazione agli specifici materiali nei quali sono stati recuperati e valutandone criticamente il possibile coinvolgimento nei processi di colonizzazione e biodeterioramento. Tale approccio consente di integrare le caratteristiche biologiche degli isolati con il contesto di esposizione dei reperti, distinguendo, ove necessario, la semplice presenza fungina dalla dimostrazione di un'effettiva attività degradativa.

Questa interpretazione assume particolare interesse anche in ambito forense, nel quale la componente fungina associata a un reperto può fornire informazioni complementari sulle condizioni di esposizione e conservazione quando viene valutata congiuntamente alla natura del substrato, al microambiente e alle altre evidenze disponibili.

4.6.1 *Alternaria*

Il genere *Alternaria* comprende funghi filamentosi dematiacei appartenenti agli Ascomycota, ampiamente diffusi nell'ambiente e frequentemente isolati dal suolo, dai residui vegetali, dall'aria e da numerosi materiali organici. Le specie del genere presentano prevalentemente un comportamento saprofito e una notevole capacità di adattamento ecologico, favorita dalla produzione di abbondanti conidi facilmente dispersi e dalla possibilità di utilizzare differenti fonti di carbonio presenti nel substrato.

Dal punto di vista del biodeterioramento, *Alternaria* può contribuire all'alterazione dei materiali attraverso la secrezione di enzimi extracellulari capaci di degradare polimeri complessi. Tale attività può determinare modificazioni cromatiche, alterazioni superficiali e progressiva perdita delle proprietà fisiche e meccaniche del substrato, soprattutto in condizioni di elevata umidità e limitata ventilazione (Gutarowska, 2014).

Nel presente lavoro, l'isolato 030-E8 recuperato dalla cintura di cuoio ha mostrato come miglior match BLAST *Lewia infectoria*. La denominazione riportata dalla sequenza di riferimento riflette una classificazione storica del taxon, mentre le revisioni filogenetiche hanno successivamente ricondotto questi funghi all'attuale circoscrizione di *Alternaria* (Lawrence et al., 2013; Woudenberg et al., 2013). Per questo motivo, nel presente lavoro il taxon viene indicato come *Alternaria infectoria*. La complessità filogenetica della sezione Infectoriae e i limiti dei marker standard nella discriminazione delle linee più strettamente correlate suggeriscono comunque cautela nell'interpretazione dell'attribuzione a livello specifico ottenuta mediante ITS (Dettman & Gerdis, 2024).

Il cuoio rappresenta un substrato organico costituito prevalentemente da collagene conciato e può presentare residui derivanti dalla lavorazione, prodotti di finissaggio, sostanze grasse e contaminanti organici accumulati durante l'utilizzo e la conservazione. Tali componenti, insieme alle condizioni microambientali del manufatto, possono aver favorito l'adesione dei propaguli e il successivo sviluppo fungino. La distribuzione ambientale della sezione Infectoriae e la capacità dei suoi membri di occupare differenti nicchie ecologiche risultano compatibili con il recupero della specie da questo tipo di reperto (Dettman & Gerdis, 2024; Silva et al., 2014).

Anche le capacità metaboliche documentate per *A. infectoria*, tra cui la presenza nelle vescicole extracellulari di proteine coinvolte nel metabolismo dei polisaccaridi e di una β -xilosidasi (Silva et

al., 2014), possono contribuire a spiegare la capacità della specie di utilizzare differenti fonti nutritive disponibili nell'ambiente. Tali evidenze non dimostrano tuttavia che l'isolato recuperato dalla cintura fosse direttamente responsabile della degradazione del collagene conciato. Il dato ottenuto documenta innanzitutto l'associazione del taxon con il reperto e deve essere interpretato congiuntamente alla natura del substrato e alle condizioni di conservazione.

Una seconda specie appartenente al genere è stata recuperata dall'ombrellone: l'isolato 029-G5 ha mostrato come miglior match BLAST *Alternaria brassicae*. *A. brassicae* presenta caratteristiche ecologiche differenti rispetto ad *A. infectoria* ed è nota principalmente come patogeno necrotrofo delle Brassicaceae, responsabile dell'*Alternaria leaf spot* in diverse colture appartenenti a questa famiglia (Rajarammohan et al., 2019). Analisi genomiche comparative hanno inoltre evidenziato caratteristiche associate allo stile di vita fitopatogeno della specie, comprendenti un ampio repertorio di proteine secrete, potenziali effettori ed enzimi attivi sui carboidrati, oltre a cluster coinvolti nella produzione di metaboliti secondari (Rajarammohan et al., 2019).

L'identificazione di *A. brassicae* nell'ombrellone deve tuttavia essere interpretata considerando la natura e la storia di esposizione del reperto. La presenza del genere *Alternaria* è compatibile con la prolungata esposizione del manufatto all'ambiente esterno, considerata l'ampia distribuzione ambientale del genere e la possibilità di dispersione dei suoi propaguli (Silva et al., 2014; Woudenberg et al., 2013). Nel caso specifico di *A. brassicae*, la sua stretta associazione con le Brassicaceae rende plausibile che il recupero dal tessuto sia riconducibile alla deposizione di propaguli di origine ambientale o vegetale, piuttosto che a una specifica affinità della specie per le fibre sintetiche (Rajarammohan et al., 2019). Polvere, residui vegetali e particolato organico depositati sulla superficie dell'ombrellone possono infatti fornire materiale organico utilizzabile dai microrganismi colonizzatori. Il tessuto sintetico potrebbe pertanto aver agito principalmente come superficie di deposizione e colonizzazione, mentre le fonti nutritive necessarie allo sviluppo fungino potrebbero essere derivate dal materiale organico esogeno accumulato sul manufatto. In questo contesto, il semplice isolamento di *A. brassicae* non costituisce una dimostrazione della capacità della specie di degradare direttamente le fibre sintetiche; le caratteristiche metaboliche descritte per la specie sono state infatti studiate prevalentemente nel contesto della sua interazione con gli ospiti vegetali (Rajarammohan et al., 2019).

Il confronto tra i due reperti sottolinea pertanto come la sola presenza di *Alternaria* non sia sufficiente a definire le modalità di colonizzazione o a dimostrare un processo di biodegradazione. Il significato del rinvenimento deve essere valutato integrando l'identificazione tassonomica con la natura del materiale, le condizioni microambientali e la storia di esposizione del reperto. Tale cautela risulta particolarmente importante anche alla luce della complessità tassonomica del genere e dei limiti dei

caratteri morfologici e dei marker molecolari standard nella discriminazione di taxa strettamente correlati (Lawrence et al., 2013; Woudenberg et al., 2013; Dettman & Gerdis, 2024).

4.6.2 *Cladosporium*

Il genere *Cladosporium* comprende funghi filamentosi dematiacei appartenenti agli Ascomycota ed è considerato uno dei taxa fungini più diffusi negli ambienti naturali e antropizzati. Le specie appartenenti a questo genere sono prevalentemente saprotrofe e vengono frequentemente isolate dall'aria, dal suolo, dalla vegetazione, dai residui organici e da numerosi materiali di interesse storico e industriale. La loro ampia distribuzione è favorita dalla produzione di abbondanti conidi secchi facilmente dispersi per via aerea, caratteristica che rende *Cladosporium* uno dei generi maggiormente rappresentati nelle comunità fungine indoor e outdoor (Bensch et al., 2012). L'elevata plasticità ecologica di *Cladosporium* consente al genere di colonizzare numerosi substrati organici, sfruttando sia i nutrienti intrinseci del materiale sia quelli derivanti dall'accumulo di polvere, residui vegetali, lipidi e altre sostanze organiche depositate sulle superfici.

Dal punto di vista del biodeterioramento, specie appartenenti al genere *Cladosporium* possono produrre enzimi extracellulari coinvolti nella degradazione di differenti componenti organiche del substrato. In particolare, sono state documentate attività cellulolitiche e ligninolitiche che evidenziano la capacità di alcuni rappresentanti del genere di agire su polimeri vegetali complessi e ne confermano il potenziale biodeteriogeno (Piazza et al., 2026). Nello studio di Piazza et al. (2026), differenti specie di *Cladosporium* hanno infatti mostrato attività ligninolitica, valutata mediante ossidazione dell'acido gallico, e attività cellulolitica, rivelata attraverso l'idrolisi della carbossimetilcellulosa (CMC). Sebbene tali prove siano state condotte su isolati associati a materiali cartacei di interesse storico, i risultati evidenziano il potenziale metabolico del genere e mostrano come differenti specie possano contribuire, in misure diverse, ai processi di alterazione dei materiali organici (Piazza et al., 2026). Condizioni caratterizzate da elevata umidità relativa, limitata ventilazione e disponibilità di nutrienti favoriscono la germinazione dei conidi e lo sviluppo del micelio, aumentando la suscettibilità dei materiali alla colonizzazione fungina (Angeles Flores et al., 2026).

Tra i substrati frequentemente colonizzati da *Cladosporium* rientra il cuoio. Orlita (2004) identifica infatti il genere tra quelli maggiormente associati al biodeterioramento dei manufatti in pelle e cuoio, evidenziando come l'assorbimento di umidità, la presenza di sostanze grasse e proteiche residue e condizioni di conservazione non ottimali possano favorire lo sviluppo fungino. L'attività metabolica del microrganismo può contribuire ad alterazioni cromatiche superficiali, sviluppo del micelio e progressiva modificazione delle proprietà del materiale, soprattutto in ambienti umidi e scarsamente aerati (Orlita, 2004).

Nel presente studio, dalla cintura di cuoio sono stati recuperati due isolati appartenenti al genere *Cladosporium*, per i quali l'analisi molecolare ha restituito come migliori corrispondenze *Cladosporium halotolerans*, per l'isolato 030-E7, e *Cladosporium eucommiae*, per l'isolato 030-F1. Il rinvenimento del genere su questo materiale risulta coerente con quanto riportato in letteratura, poiché specie di *Cladosporium* sono state descritte su numerosi substrati organici e manufatti e sono state incluse tra i micromiceti associati al biodeterioramento del cuoio (Bensch et al., 2018; Orlita, 2004; Wang et al., 2022).

Tra le due specie identificate, *C. halotolerans* presenta caratteristiche ecologiche particolarmente interessanti. La specie è stata descritta originariamente nell'ambito del *C. sphaerospermum* species complex ed è caratterizzata da una marcata alo-tolleranza e osmotolleranza. Isolati della specie sono stati recuperati da acque ipersaline, pareti di bagni, colture cellulari vegetali e altri substrati, suggerendo un'ampia capacità di dispersione e colonizzazione di superfici differenti (Zalar et al., 2007). Gli stessi autori sottolineano come l'eterogeneità dei substrati dai quali *C. halotolerans* è stato recuperato sia compatibile con una dispersione per via aerea e con la possibilità di colonizzare differenti superfici quando le condizioni risultano favorevoli (Zalar et al., 2007). La capacità della specie di persistere in condizioni caratterizzate da disponibilità idrica variabile assume particolare interesse anche nel contesto degli ambienti indoor. In un ampio studio sulla micobiota degli ambienti interni, *C. halotolerans* è risultata infatti la specie di *Cladosporium* più frequentemente isolata, con 144 isolati, e la capacità dei membri del *C. sphaerospermum* species complex di crescere a valori relativamente bassi di attività dell'acqua è stata indicata come un possibile vantaggio per la sopravvivenza sulle superfici indoor (Bensch et al., 2018). Tale caratteristica risulta particolarmente pertinente per la cintura analizzata nel presente studio, conservata per un periodo prolungato all'interno di un armadio, dove la limitata ventilazione e le possibili variazioni locali di umidità possono aver contribuito alla formazione di condizioni favorevoli alla persistenza e allo sviluppo fungino. Non è quindi necessario ipotizzare condizioni estremamente umide: la tolleranza di *C. halotolerans* alle variazioni della disponibilità d'acqua rende biologicamente plausibile il suo recupero anche da una superficie conservata in ambiente domestico (Bensch et al., 2018; Zalar et al., 2007).

Oltre alla plasticità ecologica, per *C. halotolerans* sono state documentate capacità metaboliche potenzialmente rilevanti nei processi di biodeterioramento. Di Napoli et al. (2023) hanno dimostrato sperimentalmente la capacità di un isolato di *C. halotolerans* di crescere in presenza di polietilene ad alta densità (HDPE), aderire al materiale mediante le ife e secernere enzimi coinvolti nei processi di degradazione del polimero. In particolare, gli autori hanno rilevato attività ossidoreduttasica e modificazioni del profilo delle proteine extracellulari in presenza di HDPE (Di Napoli et al., 2023).

Analogamente, Zhang et al. (2022) hanno dimostrato, in uno specifico ceppo marino di *C. halotolerans*, la degradazione di un poliestere-poliuretano, associata all'attività di esterasi e all'espressione di enzimi extracellulari quali cutinasi, lipasi e perossidasi (K. Zhang et al., 2022). Questi risultati documentano quindi una notevole versatilità metabolica di *C. halotolerans*, ma non consentono di concludere che l'isolato recuperato nel presente studio abbia degradato direttamente il cuoio. Gli studi citati riguardano infatti ceppi differenti e substrati polimerici differenti dal collagene conciato della cintura (Di Napoli et al., 2023; K. Zhang et al., 2022).

Nel presente caso, tali evidenze possono essere utilizzate esclusivamente per sostenere la plausibilità biologica di capacità extracellulari e di colonizzazione della specie, mentre l'attribuzione di un effettivo ruolo nel biodeterioramento della cintura richiederebbe analisi specifiche delle modificazioni chimiche e strutturali del materiale.

Differente è il quadro relativo a *C. eucommiae*, specie descritta recentemente da Wang et al. (2022). Il taxon è stato isolato originariamente dalla lettiera fogliare di *Eucommia ulmoides* in Cina ed è stato delimitato attraverso un approccio integrato basato sulle caratteristiche morfologiche e sull'analisi filogenetica combinata delle regioni ITS e dei geni *tefl* e *act* (Wang et al., 2022). Gli autori collocano la specie nell'ambito di un genere ubiquitario, prevalentemente saprotrofo, i cui membri sono stati isolati da una grande varietà di matrici, tra cui aria, suolo, piante, alimenti, detriti, tessuti, pitture e altri materiali organici (Wang et al., 2022).

A differenza di *C. halotolerans*, tuttavia, per *C. eucommiae* non risultano nel lavoro di descrizione evidenze specifiche relative alla colonizzazione o al biodeterioramento del cuoio, né vengono documentate capacità enzimatiche direttamente riferibili alla degradazione di questo materiale. Il suo recupero dalla cintura deve pertanto essere interpretato con maggiore cautela. La presenza della specie potrebbe essere compatibile con una contaminazione ambientale e con la successiva colonizzazione della superficie del manufatto, favorita dalla disponibilità di umidità e dalla presenza di sostanze organiche utilizzabili come nutrienti. Tale interpretazione è coerente con l'ampia varietà di substrati colonizzati dal genere *Cladosporium*, ma non permette di attribuire a *C. eucommiae* una specifica attività degradativa nei confronti del cuoio (Orlita, 2004; Wang et al., 2022).

In conclusione, il recupero contemporaneo di *C. halotolerans* e *C. eucommiae* dalla cintura evidenzia come la colonizzazione del cuoio possa coinvolgere taxa caratterizzati da ecologie differenti. La natura organica e igroscopica del materiale, la presenza di componenti lipidiche e proteiche residue e di contaminanti accumulati durante l'utilizzo, insieme alle condizioni microambientali di conservazione, possono aver favorito l'insediamento dei propaguli e lo sviluppo del micelio (Orlita, 2004).

4.6.3 *Curvularia*

Il genere *Curvularia*, appartenente alla famiglia Pleosporaceae (Ascomycota), comprende funghi filamentosi dematiacei ampiamente distribuiti negli ecosistemi terrestri. Le specie del genere sono prevalentemente note come fitopatogene, ma possono comportarsi anche come saprotrofe ed essere isolate da suolo, aria, acqua e numerosi substrati organici, evidenziando una notevole plasticità ecologica.

Sebbene il genere sia conosciuto soprattutto per il ruolo fitopatogeno, diverse specie possiedono un metabolismo capace di utilizzare differenti fonti di carbonio attraverso la produzione di enzimi extracellulari e metaboliti secondari. Tali caratteristiche favoriscono la colonizzazione di substrati organici in presenza di condizioni ambientali idonee. Il biodeterioramento fungino può infatti essere associato alla secrezione di enzimi idrolitici, acidi organici e pigmenti, capaci di determinare alterazioni chimiche, fisiche ed estetiche dei materiali colonizzati (Angeles Flores et al., 2026). La produzione di pigmenti melanizzati e metaboliti secondari può inoltre contribuire alla comparsa di alterazioni cromatiche e modificazioni superficiali del substrato.

Nel presente studio, un isolato recuperato dal tessuto sintetico dell'ombrellone e preliminarmente attribuito, sulla base delle caratteristiche macro- e micromorfologiche, al genere *Curvularia* ha mostrato come miglior match BLAST *Curvularia pseudolunata*.

C. pseudolunata è una specie descritta da Madrid et al. (2014) nell'ambito di una revisione molecolare e morfologica del genere *Curvularia*. La specie è stata delimitata mediante un approccio filogenetico multilocus basato sulle regioni ITS e LSU e sui geni *gpd* e *RPB2*, evidenziando la necessità di integrare più marcatori per discriminare taxa strettamente correlati all'interno del genere (Madrid et al., 2014). In particolare, *C. pseudolunata* è filogeneticamente vicina e morfologicamente simile a *C. lunata*, dalla quale può essere distinta attraverso l'integrazione dei caratteri morfologici e dei dati molecolari (Madrid et al., 2014). Questa complessità tassonomica risulta particolarmente importante per l'interpretazione dell'isolato ottenuto nel presente studio. Madrid et al. (2014) hanno infatti evidenziato che le regioni ITS e LSU, considerate singolarmente, presentano una capacità discriminante inferiore rispetto ad altri loci nella separazione di alcune specie di *Curvularia*, mentre *RPB2* è risultato uno dei marcatori maggiormente informativi (Madrid et al., 2014).

Studi multilocus successivi hanno ulteriormente mostrato come *C. pseudolunata* possa risultare estremamente vicina ad altri taxa sulla base di ITS e *GAPDH*, mentre differenze più evidenti emergono considerando *RPB2* (Marin-Felix et al., 2020). Pertanto, nel presente lavoro l'attribuzione a *C. pseudolunata*, ottenuta mediante ITS e caratterizzata da un'identità del 96,88%, deve essere considerata prudenziale e potrebbe essere ulteriormente verificata in futuro mediante marcatori secondari maggiormente discriminanti.

Le informazioni ecologiche disponibili specificamente per *C. pseudolunata* sono tuttavia ancora limitate. La specie è stata originariamente descritta a partire da un isolato proveniente da un seno nasale umano negli Stati Uniti, e la letteratura tassonomica successiva continua a riportarla principalmente nell'ambito di isolati di origine clinica (Madrid et al., 2014; Marin-Felix et al., 2020). Di conseguenza, non esistono attualmente evidenze sufficienti per considerare *C. pseudolunata* una specie specificamente associata ai materiali tessili sintetici o al loro biodeterioramento. L'interpretazione ecologica del suo recupero dall'ombrellone deve quindi basarsi anche sulle caratteristiche più generali del genere *Curvularia*, i cui rappresentanti sono ampiamente distribuiti in differenti ambienti e comprendono specie associate al suolo, ai vegetali e ai residui organici (Khan et al., 2023).

Nel caso dell'ombrellone, il rinvenimento appare compatibile con la prolungata esposizione del manufatto all'ambiente esterno. Durante il periodo di utilizzo, il tessuto è stato infatti sottoposto all'azione degli agenti atmosferici, a cicli ripetuti di bagnamento e asciugatura e alla deposizione di polvere, particelle di terreno, pollini e residui vegetali. Tali materiali possono costituire sia una fonte di propaguli fungini sia una riserva di sostanza organica utilizzabile dai microrganismi colonizzatori. La ritenzione locale di acqua e materiale organico in corrispondenza di cuciture, pieghe e irregolarità superficiali può inoltre generare microambienti maggiormente favorevoli alla germinazione dei conidi e allo sviluppo del micelio (Angeles Flores et al., 2026).

Considerata la natura sintetica del campione, tuttavia, il recupero di *C. pseudolunata* non dimostra che il polimero costitutivo dell'ombrellone sia stato utilizzato direttamente come fonte di carbonio. I materiali sintetici possono infatti essere soggetti a biodeterioramento anche senza una completa biodegradazione della matrice polimerica. Tra i meccanismi descritti rientrano il biofouling superficiale, l'utilizzo di additivi o contaminanti organici, la penetrazione delle ife nelle microirregolarità del materiale, l'aumento della ritenzione d'acqua e le alterazioni cromatiche e funzionali della superficie (Flemming, 2010).

Nel campione analizzato è quindi plausibile che il tessuto abbia agito almeno inizialmente come supporto fisico per la deposizione e la crescita fungina, mentre una parte delle risorse nutritive necessarie allo sviluppo del micelio potrebbe essere stata fornita dal materiale organico esogeno accumulato sulla superficie.

In conclusione, il miglior match con *C. pseudolunata* risulta compatibile con la presenza di *Curvularia* su un manufatto sottoposto a prolungata esposizione ambientale, ma il significato del ritrovamento deve essere interpretato tenendo conto sia della limitata conoscenza ecologica specifica della specie sia del supporto molecolare non pienamente conclusivo ottenuto mediante ITS (Madrid et al., 2014; (Marin-Felix et al., 2020). Nel campione analizzato, la deposizione ambientale dei

propaguli e la presenza di materiale organico e umidità sulla superficie rappresentano quindi una spiegazione plausibile della colonizzazione. Le capacità degradative documentate per altri membri del genere permettono di ipotizzare un potenziale contributo di *Curvularia* ai fenomeni di alterazione superficiale, ma non consentono di attribuire a *C. pseudolunata* una degradazione diretta del polimero. La dimostrazione di tale processo richiederebbe analisi specifiche del materiale e prove sperimentali condotte sull'isolato ottenuto nel presente studio.

4.6.4 *Fusarium*

Il genere *Fusarium* comprende funghi filamentosi appartenenti agli Ascomycota, ampiamente distribuiti negli ecosistemi naturali e antropizzati. Le specie del genere sono frequentemente rinvenute nel suolo, nell'aria, nell'acqua e sui residui vegetali e possono assumere comportamenti saprofiti, endofitici o patogeni. La capacità di persistere nel terreno e sulla sostanza organica, insieme alla dispersione dei propaguli, favorisce la colonizzazione di substrati differenti e ne spiega l'ampia distribuzione ambientale (Ekwomadu & Mwanza, 2023). In alcune specie, inoltre, la formazione di strutture di resistenza consente una prolungata permanenza nel suolo e la successiva germinazione in presenza di condizioni ambientali favorevoli e nuova sostanza organica (Davis et al., 2006).

Dal punto di vista del biodeterioramento, diverse specie di *Fusarium* possiedono un apparato enzimatico extracellulare capace di agire su differenti componenti polisaccaridiche. Kwon et al. (2007), analizzando 37 specie del genere, hanno documentato attività β -glucosidasi, amilasi, xilanasi e pectinasi, con una significativa variabilità tra le specie considerate. In particolare, 36 delle 37 specie analizzate hanno mostrato una marcata attività β -glucosidasi, mentre diverse specie hanno presentato attività xilanasi e pectinasi; *F. oxysporum* e *F. proliferatum* hanno mostrato entrambe queste attività in misura elevata (Kwon et al., 2007). Lo stesso studio non ha tuttavia evidenziato una chiara attività cellulolitica nelle specie analizzate, indicando come le capacità degradative non possano essere generalizzate all'intero genere (Kwon et al., 2007).

Nel presente lavoro, isolati appartenenti al genere *Fusarium* sono stati recuperati da due reperti differenti: dalla camicia di cotone e dal tessuto sintetico dell'ombrellone. La caratterizzazione molecolare ha consentito di affinare le attribuzioni preliminari ottenute mediante osservazione macro- e micromorfologica: l'isolato 029-F4 proveniente dalla camicia è stato identificato come *Fusarium oxysporum* mentre l'isolato 029-F7 recuperato dall'ombrellone ha mostrato come miglior match *Fusarium acuminatum*.

Il rinvenimento di *F. oxysporum* nella camicia di cotone risulta particolarmente interessante in relazione alla natura cellulosica del materiale. *F. oxysporum* è, infatti, una specie comunemente

associata al suolo e comprende ceppi dotati di sistemi enzimatici in grado di utilizzare substrati vegetali e polisaccaridi complessi (Ekwomadu & Mwanza, 2023).

In particolare, Abdel-Rahman et al. (1992) ha dimostrato che ceppi di *F. oxysporum* sono in grado di degradare preparazioni di parete cellulare di cotone, attraverso la produzione extracellulare di cellulasi, xilanasi, mannanasi, arabanasi e galattanasi (Abdel-Rahman et al., 1992). Nello stesso studio, *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, coltivato utilizzando pareti cellulari di cotone come fonte di carbonio, ha prodotto enzimi extracellulari attivi nella degradazione del substrato e capaci di liberare monosaccaridi quali glucosio, galattosio, arabinosio, xilosio e mannosio, evidenziando la capacità del sistema enzimatico fungino di agire sui polisaccaridi della parete vegetale (Abdel-Rahman et al., 1992).

Questa capacità è supportata anche da altri studi. La produzione di enzimi pectolitici e cellulolitici da parte di *F. oxysporum* varia in funzione della fonte di carbonio disponibile e il cotone è risultato uno dei substrati in grado di sostenere un'elevata produzione di cellulasi nella specie (Abdel-Rahman et al., 1992).

Più recentemente, Dutta et al. (2018) hanno caratterizzato isolati di *F. oxysporum* provenienti dal suolo e dimostrato attività cellulolitica mediante saggi su carbossimetilcellulosa, carta da filtro e cotone, confermando il potenziale cellulolitico di differenti ceppi della specie. Anche la capacità di utilizzare direttamente la cellulosa come substrato metabolico è stata documentata in ceppi di *F. oxysporum*, nei quali la cellulosa può essere depolimerizzata e successivamente utilizzata nei processi fermentativi (Christakopoulos et al., 1989).

Nel presente campione, *F. oxysporum* è stato recuperato specificamente dai “brandelli bianchi” della camicia, costituiti da frammenti separati dal corpo principale dell'indumento. Tale localizzazione appare coerente con la precedente permanenza della camicia nel terreno, ambiente nel quale *Fusarium* è frequentemente presente e dal quale propaguli fungini possono essere trasferiti al tessuto attraverso il contatto diretto con terreno, residui vegetali e materiale organico (Ekwomadu & Mwanza, 2023). La successiva conservazione del reperto nella stessa busta di plastica utilizzata dopo il recupero può inoltre aver favorito il mantenimento dell'umidità nelle fibre e la persistenza di condizioni microambientali favorevoli alla crescita fungina. La presenza dell'isolato proprio nei frammenti maggiormente deteriorati è quindi biologicamente interessante. La frammentazione aumenta infatti la superficie esposta, produce margini sfrangiati e facilita la ritenzione di terreno, acqua e residui organici, creando potenziali punti di colonizzazione del micelio.

Alla luce delle capacità cellulolitiche documentate per *F. oxysporum*, è biologicamente plausibile ipotizzare che la specie abbia potuto contribuire ai processi di alterazione della componente cellulosica del cotone (Abdel-Rahman et al., 1992; Dutta et al., 2018).

Tuttavia, la presenza di *F. oxysporum* nei brandelli non dimostra che il fungo sia responsabile della frammentazione della camicia. Gli studi citati documentano il potenziale cellulolitico di specifici ceppi di *F. oxysporum* in condizioni sperimentali, ma non consentono di trasferire automaticamente tale capacità all'isolato recuperato nel presente studio. Per dimostrare un contributo diretto alla degradazione delle fibre sarebbe infatti necessario evidenziare modificazioni strutturali o chimiche della cellulosa e collegarle sperimentalmente all'attività dell'isolato.

Differente è l'interpretazione relativa a *Fusarium acuminatum*, recuperato dal tessuto sintetico dell'ombrellone. Anche in questo caso la prolungata esposizione del manufatto all'ambiente esterno costituisce un elemento importante: propaguli fungini provenienti da terreno, vegetazione e particolato atmosferico possono depositarsi sulla superficie del tessuto, mentre polvere, pollini e residui vegetali possono accumularsi nelle pieghe, nelle cuciture e nelle irregolarità del materiale. I cicli di bagnamento e asciugatura ai quali l'ombrellone è stato sottoposto possono inoltre aver determinato microzone temporaneamente caratterizzate da maggiore disponibilità idrica, favorendo la germinazione dei conidi e la crescita del micelio.

Per *F. acuminatum* sono state documentate capacità metaboliche nei confronti di composti organici utilizzati anche nell'industria tessile. Yücel (2018) ha studiato la capacità di *F. acuminatum* di rimuovere il colorante azoico metil arancio utilizzando pellet fungini vitali. La specie ha mostrato una significativa capacità di decolorazione, con valori prossimi al 70% in condizioni di pH acido e con un optimum sperimentale intorno a 35 °C, indicando la possibilità per *F. acuminatum* di interagire con e rimuovere composti organici aromatici complessi (Yücel, 2018). Questo risultato è rilevante per descrivere la versatilità metabolica di *F. acuminatum*, ma deve essere interpretato correttamente nel contesto dell'ombrellone. Lo studio di Yücel (2018) riguarda infatti la rimozione del metil arancio da una soluzione acquosa e non la degradazione di fibre tessili sintetiche. Non costituisce quindi una prova della capacità della specie di utilizzare direttamente il polimero dell'ombrellone come fonte di carbonio.

Nel presente campione è, pertanto, più prudente interpretare il tessuto sintetico principalmente come una superficie di colonizzazione. La crescita di *F. acuminatum* potrebbe essere stata sostenuta dalla sostanza organica depositata sul materiale durante l'esposizione ambientale piuttosto che dalla degradazione diretta della matrice polimerica. Le capacità metaboliche documentate per la specie, compresa la trasformazione o rimozione di composti organici come i coloranti azoici, rendono plausibile un suo coinvolgimento in fenomeni di alterazione superficiale, ma non consentono di attribuirle una biodegradazione diretta delle fibre sintetiche (Yücel, 2018).

In conclusione, il recupero di *F. oxysporum* dalla camicia di cotone e di *F. acuminatum* dall'ombrellone sintetico evidenzia modalità di colonizzazione differenti.

Nel primo caso, la natura cellulosica del substrato e le capacità cellulolitiche sperimentalmente documentate per *F. oxysporum* rendono plausibile un possibile contributo della specie ai processi di alterazione del cotone, pur in assenza di una dimostrazione diretta sul reperto analizzato (Abdel-Rahman et al., 1992; Dutta et al., 2018). Nel secondo caso, il recupero di *F. acuminatum* appare invece maggiormente interpretabile alla luce della prolungata esposizione ambientale dell'ombrellone e dell'accumulo di materiale organico sulla superficie; le capacità metaboliche note della specie supportano la possibilità di interazioni con composti organici, ma non dimostrano una degradazione diretta del polimero sintetico (Yücel, 2018).

4.6.5 *Humicola*

Il genere *Humicola* comprende funghi filamentosi prevalentemente saprotrofi, associati a substrati organici di origine vegetale e caratterizzati da un rilevante potenziale cellulolitico. Diversi rappresentanti del genere sono stati studiati per la capacità di produrre sistemi enzimatici extracellulari coinvolti nella degradazione della cellulosa e dell'emicellulosa, proprietà di particolare interesse nell'interazione con materiali costituiti da fibre vegetali (Kuhad et al., 2011).

La degradazione della cellulosa richiede l'azione coordinata di differenti enzimi. Le endoglucanasi idrolizzano i legami β -1,4-glicosidici all'interno delle catene cellulosiche, agendo preferenzialmente nelle regioni meno ordinate della fibra; le cellobioidrolasi o esoglucanasi intervengono progressivamente sulle estremità delle catene, liberando prevalentemente cellobiosio, mentre le β -glucosidasi completano il processo mediante l'idrolisi del cellobiosio a glucosio (Kuhad et al., 2011; Schülein, 1997).

L'attività cellulolitica non dipende tuttavia esclusivamente dalla presenza degli enzimi, ma è influenzata anche dalle caratteristiche del substrato e dalle condizioni ambientali. L'espressione di cellulasi ed emicellulasi può infatti essere modulata dalla disponibilità delle fonti di carbonio e da specifici meccanismi di regolazione metabolica, determinando variazioni nell'intensità dell'attività degradativa in funzione delle condizioni di crescita (Xu et al., 2019).

Nel presente studio, l'isolato 029-E1 recuperato dalla camicia di cotone ha mostrato come miglior match BLAST *Humicola fuscoatra*, confermato dopo un'analisi congiunta alle caratteristiche morfologiche dell'isolato.

L'interesse di *H. fuscoatra* nel presente lavoro è rafforzato dal fatto che, a differenza di quanto riportato genericamente per il genere, la capacità cellulolitica della specie è stata dimostrata sperimentalmente.

Baldeep et al. (2015) hanno studiato la produzione di cellulasi da parte di *H. fuscoatra* MTCC 1409 utilizzando paglia di riso come substrato lignocellulosico. Gli autori hanno rilevato la produzione di

differenti componenti del sistema cellulolitico e hanno dimostrato che il trattamento con gli enzimi prodotti dal fungo determinava una progressiva riduzione delle componenti fibrose del substrato (Baldeep et al., 2015). In particolare, nelle condizioni sperimentali considerate, il contenuto di cellulosa e di emicellulosa è diminuito rispettivamente del 10,8% e del 23,4%, fornendo un'evidenza diretta dell'attività degli enzimi prodotti dalla specie nei confronti di una matrice vegetale lignocellulosica (Baldeep et al., 2015).

Il sistema cellulolitico di *H. fuscoatra* è stato ulteriormente approfondito da Bhatia et al. (2018), che hanno caratterizzato la cellobiasi prodotta dal ceppo MTCC 1409. La cellobiasi rappresenta una componente essenziale del complesso cellulolitico, poiché completa l'idrolisi della cellulosa convertendo il cellobiosio in glucosio e contribuendo così all'efficienza complessiva del processo degradativo. Gli autori hanno identificato due isoforme della cellobiasi, C-I e C-II, entrambe caratterizzate da un optimum di attività a pH 6,0 e 50 °C e da stabilità in un ampio intervallo di temperatura, confermando ulteriormente il potenziale cellulolitico della specie (Bhatia et al., 2018). Ulteriori evidenze sono state fornite da Hasanin et al. (2018), che hanno isolato un ceppo di *H. fuscoatra* da residui agricoli e ne hanno studiato la capacità di produrre enzimi in grado di modificare la cellulosa microcristallina. L'attività fungina è stata utilizzata per ottenere nanofibre di cellulosa attraverso l'idrolisi enzimatica della componente maggiormente accessibile della matrice cellulosica, dimostrando ancora una volta la capacità della specie di interagire direttamente con substrati ricchi in cellulosa (Hasanin et al., 2018).

Il ritrovamento risulta particolarmente interessante in relazione alla natura del materiale, poiché il cotone è costituito prevalentemente da cellulosa e rappresenta pertanto un substrato potenzialmente suscettibile all'attività di funghi dotati di un sistema cellulolitico articolato. Le capacità enzimatiche documentate specificamente per *H. fuscoatra* rendono, di conseguenza, biologicamente plausibile un suo contributo ai processi di alterazione della matrice fibrosa del campione (Baldeep et al., 2015; Bhatia et al., 2018; Hasanin et al., 2018).

Anche la localizzazione dell'isolato nel colletto annerito risulta rilevante. Questa porzione dell'indumento presenta pieghe, cuciture e strati di tessuto sovrapposti, caratteristiche che possono favorire la ritenzione di acqua, terreno e residui organici. La precedente permanenza della camicia nel terreno ha inoltre esposto direttamente il tessuto a propaguli fungini e sostanza organica, mentre la successiva conservazione nella busta di plastica può aver limitato l'evaporazione dell'acqua e il ricambio d'aria, contribuendo al mantenimento di condizioni favorevoli alla crescita del micelio.

L'associazione tra *H. fuscoatra* e la porzione macroscopicamente annerita non consente tuttavia di attribuire alla specie l'alterazione cromatica osservata né di dimostrare che essa sia responsabile dell'intero processo di deterioramento.

In conclusione, la corrispondenza tra composizione del substrato, localizzazione dell'isolato e caratteristiche metaboliche note di *H. fuscoatra* rende plausibile un suo contributo al biodeterioramento locale del colletto, pur senza costituire una prova diretta della degradazione delle fibre della camicia (Baldeep et al., 2015; Bhatia et al., 2018; Hasanin et al., 2018).

4.6.6 *Mucor*

Il genere *Mucor* appartiene all'ordine Mucorales, incluso nel phylum Mucoromycota, e comprende numerose specie ubiquitarie prevalentemente saprotrofe, frequentemente associate al suolo, alla materia organica in decomposizione e ad altri substrati umidi ricchi di nutrienti. I Mucorales rappresentano, infatti, una componente comune dell'ambiente e mostrano una particolare capacità di colonizzare materiali organici caratterizzati da elevata disponibilità d'acqua (Walther et al., 2019). Dal punto di vista morfologico, le specie di *Mucor* sono generalmente caratterizzate da ife larghe cenocitiche o scarsamente settate e da riproduzione asessuata mediante sporangi plurisporei portati da sporangiofori; la riproduzione sessuata avviene invece mediante formazione di zigospore (Morin-Sardin et al., 2017; Walther et al., 2019).

Le specie di *Mucor* sono particolarmente adattate alla colonizzazione di substrati caratterizzati da elevata disponibilità di acqua e sostanza organica. La maggior parte mostra infatti una preferenza per valori relativamente elevati di attività dell'acqua, mentre la rapida germinazione delle spore e l'elevata velocità di crescita consentono al genere di sfruttare efficacemente condizioni ambientali favorevoli (Morin-Sardin et al., 2017). Questa strategia ecologica contribuisce alla frequente presenza dei Mucorales su materiali umidi e in decomposizione, sui quali possono comportarsi come colonizzatori opportunisti e organismi alterativi (Walther et al., 2019).

Dal punto di vista metabolico, *Mucor* comprende specie capaci di utilizzare differenti fonti di carbonio e di produrre enzimi extracellulari coinvolti nella trasformazione della sostanza organica, tra cui amilasi e attività cellulolitiche, contribuendo ai primi stadi dei processi decompositivi (Morin-Sardin et al., 2017). La presenza di rappresentanti del genere su reperti o substrati esposti a specifiche condizioni ambientali deve tuttavia essere interpretata nel contesto complessivo del materiale e del microambiente, poiché in ambito forense la componente fungina assume maggiore valore informativo quando integrata con le altre evidenze ecologiche e microbiologiche disponibili (Karanth & Isukapatha, 2026b).

Nel presente lavoro, *Mucor circinelloides* è stato identificato nel tessuto sintetico del copridivano, conservato per un lungo periodo in una cantina privata caratterizzata da elevata umidità, ridotta ventilazione, limitata illuminazione e accumulo di polvere e materiale organico. L'isolato,

inizialmente attribuito al genere *Mucor* sulla base delle caratteristiche macro- e micro-morfologiche, è stato successivamente identificato a livello di specie mediante caratterizzazione molecolare.

Il ritrovamento appare coerente con l'ecologia del genere, le cui specie sono prevalentemente saprotrofe, caratterizzate da crescita rapida e frequentemente associate ad ambienti umidi e ricchi di sostanza organica. Le spore di *Mucor* mostrano inoltre una buona capacità di aderire alle superfici e di germinare rapidamente in presenza di elevata disponibilità d'acqua, contribuendo all'elevato potenziale di colonizzazione del genere (Morin-Sardin et al., 2017).

In *M. circinelloides* è stata inoltre descritta una marcata plasticità fisiologica, comprendente la capacità di modificare la forma di crescita in funzione delle condizioni ambientali, in particolare della disponibilità di ossigeno (Morin-Sardin et al., 2017).

Dal punto di vista funzionale, *M. circinelloides* possiede un articolato apparato enzimatico in grado di agire su differenti componenti organiche. Baba et al. (2005) hanno identificato due endoglucanasi, MCE1 e MCE2, appartenenti alla famiglia 45 delle glicoside-idrolasi, mentre Huang et al. (2014) hanno descritto nel genoma della specie differenti famiglie di glicoside-idrolasi e una β -glucosidasi coinvolta nelle fasi finali dell'idrolisi della cellulosa. Tali dati evidenziano il potenziale cellulolitico della specie e la capacità di utilizzare substrati ricchi in polisaccaridi complessi (Baba et al., 2005; Huang et al., 2014).

Questa capacità è stata confermata anche sperimentalmente da Geethanjali et al. (2020), che hanno valutato un isolato di *M. circinelloides* su differenti residui agricoli, osservando crescita estesa e infiltrazione ifale nei substrati, insieme alla progressiva riduzione della sostanza organica e alla produzione di enzimi ligninolitici e cellulolitici, tra cui laccasi, manganese perossidasi, lignina perossidasi e carbossimetilcellulasi (Geethanjali et al., 2020). Il fungo ha inoltre mostrato una crescita particolarmente rapida sulla paglia di riso, confermando la capacità della specie di colonizzare substrati lignocellulosici complessi (Geethanjali et al., 2020).

La versatilità metabolica di *M. circinelloides* non è limitata ai polisaccaridi. Yehia (2023) ha infatti dimostrato la capacità della specie di utilizzare il petrolio greggio come fonte di carbonio, associata alla produzione di biosurfattanti ed enzimi ossidativi, evidenziandone ulteriormente l'adattabilità metabolica (Yehia, 2023).

Nel caso del copridivano, tuttavia, la natura sintetica del materiale richiede cautela nell'interpretazione del possibile ruolo degradativo. Le attività cellulolitiche e ligninolitiche documentate per *M. circinelloides* riguardano principalmente substrati organici e lignocellulosici e non dimostrano che il fungo abbia utilizzato direttamente il polimero costitutivo del tessuto come fonte di carbonio. È quindi più plausibile che il copridivano abbia rappresentato soprattutto un supporto fisico per la colonizzazione, mentre polvere, residui organici e altre sostanze accumulate

sulla superficie abbiano fornito le risorse nutritive necessarie allo sviluppo del micelio (Baba et al., 2005; Geethanjali et al., 2020; Huang et al., 2014)

In conclusione, la capacità di *M. circinelloides* di produrre glicoside-idrolasi, enzimi ligninolitici, biosurfattanti ed enzimi ossidativi rende biologicamente plausibile un suo contributo ai processi di alterazione superficiale del manufatto, senza tuttavia consentire di attribuirgli una degradazione diretta delle fibre sintetiche in assenza di specifiche analisi chimiche e strutturali del materiale (Baba et al., 2005; Geethanjali et al., 2020; Huang et al., 2014; Yehia, 2023).

4.6.7 *Penicillium*

Il genere *Penicillium* comprende funghi filamentosi appartenenti agli Ascomycota, caratterizzati da distribuzione cosmopolita e da un'elevata capacità di colonizzare substrati di diversa natura. I conidi, facilmente dispersi nell'aria, possono depositarsi su numerose superfici e germinare in presenza di condizioni favorevoli.

La plasticità metabolica e la capacità di crescere anche in ambienti relativamente poveri di nutrienti rendono *Penicillium* uno dei generi frequentemente associati al biodeterioramento di materiali organici e antropici (Angeles Flores et al., 2026; Gadd et al., 2024). Dal punto di vista del biodeterioramento, *Penicillium* può agire attraverso meccanismi sia fisici sia biochimici: la crescita e la penetrazione delle ife possono contribuire alla disgregazione della struttura del materiale, mentre la produzione di enzimi extracellulari, tra cui cellulasi, emicellulasi e proteasi, consente l'utilizzo di differenti componenti organiche. A questi processi possono associarsi la produzione di acidi organici e metaboliti pigmentati, con conseguenti alterazioni cromatiche, modificazioni locali del pH e progressivo indebolimento del substrato (Angeles Flores et al., 2026; Gadd et al., 2024). La colonizzazione è, inoltre, fortemente condizionata dall'umidità, dalla ventilazione e dalla disponibilità di sostanza organica.

Nel presente lavoro, *Penicillium* è risultato uno dei generi maggiormente distribuiti tra i reperti analizzati, essendo stato recuperato in tre differenti tipologie di materiale.

L'analisi molecolare ha consentito di identificare *Penicillium citrinum* negli isolati 029-E3, 029-E4 e 029-F5 della camicia di cotone, *P. dipodomyicola* nell'isolato 030-E9 della cintura di cuoio e *P. elantae* nell'isolato 029-G4ell'ombrellone in fibre sintetiche. La presenza del genere su materiali profondamente differenti risulta coerente con la sua ampia diffusione ambientale, ma suggerisce modalità di colonizzazione che devono essere interpretate separatamente in funzione della specie, della composizione del substrato e delle condizioni alle quali ciascun reperto è stato esposto.

Nella camicia di cotone sono stati identificati tre isolati di *P. citrinum*. L'associazione di questa specie con un materiale prevalentemente cellulosico risulta particolarmente interessante, poiché per *P.*

citrinum sono state documentate sperimentalmente capacità cellulolitiche. Dutta et al. (2008) hanno dimostrato la produzione da parte di *P. citrinum* MTCC 6489 di un complesso cellulolitico extracellulare comprendente attività endoglucanasica e FPase, evidenziando la capacità della specie di agire su substrati vegetali ricchi in cellulosa (T. Dutta et al., 2008). Gli autori hanno inoltre evidenziato la presenza di attività sia endo- sia eso-idrolitiche, compatibili con la degradazione di differenti componenti della matrice cellulosica (T. Dutta et al., 2008).

Un'associazione particolarmente pertinente al presente studio è stata riportata anche da Abdel-Maksoud et al. (2022), che hanno recuperato *P. citrinum* da un manoscritto storico comprendente carta di cotone e hanno documentato attività cellulolitica negli isolati analizzati. In particolare, uno degli isolati di *P. citrinum* ha mostrato la maggiore attività cellulolitica tra i funghi sottoposti a valutazione, confermando il potenziale della specie nell'interazione con substrati cellulosici (Abdel-Maksoud et al., 2022). Anche Wei et al. (2026), nell'ambito dello studio del deterioramento fungino di manufatti tessili, riportano *P. citrinum* tra i taxa recuperati da indumenti interessati da crescita fungina, rafforzando l'associazione della specie con questo tipo di materiale (Wei et al., 2026).

Nel caso della camicia analizzata, la precedente permanenza nel terreno può aver favorito il trasferimento dei propaguli sul tessuto, mentre la successiva conservazione nella busta di plastica può aver contribuito al mantenimento dell'umidità nelle fibre e alla formazione di condizioni favorevoli alla crescita fungina.

La presenza di *P. citrinum* su un substrato costituito prevalentemente da cellulosa, insieme alle capacità cellulolitiche sperimentalmente documentate per la specie, rende quindi biologicamente plausibile un suo contributo ai fenomeni di alterazione del cotone (Abdel-Maksoud et al., 2022; T. Dutta et al., 2018). Ciò non consente tuttavia di concludere che gli isolati recuperati siano stati direttamente responsabili della degradazione osservata nel reperto, poiché tale relazione richiederebbe specifiche analisi strutturali e chimiche delle fibre.

Differente è l'interpretazione di *P. dipodomyicola*, identificato nella cintura di cuoio. Per questa specie, i lavori considerati non documentano direttamente una capacità di degradare il cuoio; risulta quindi più corretto interpretare il ritrovamento alla luce delle conoscenze disponibili per il genere *Penicillium*. Il cuoio costituisce infatti una matrice organica prevalentemente di collagene e può contenere ulteriori componenti e residui organici utilizzabili dai microrganismi. La capacità di *Penicillium* di partecipare al biodeterioramento del cuoio è stata dimostrata sperimentalmente da Zhang et al. (2017), che hanno studiato la crescita di un *Penicillium* sp. su cuoio conciato al cromo, osservando alterazioni strutturali e termiche del materiale associate alla produzione di proteasi e alla modificazione della componente di collagene (J. Zhang et al., 2017).

Nel lavoro di Zhang et al. (2017), la crescita fungina è stata associata alla compromissione della struttura del collagene conciato e a fenomeni di detanning, dimostrando che rappresentanti del genere possono contribuire attivamente al biodeterioramento di questo materiale. Tale evidenza rende plausibile l'associazione di *Penicillium* con la cintura analizzata nel presente studio, ma non consente di attribuire automaticamente a *P. dipodomyicola* le capacità proteolitiche osservate nel ceppo studiato da Zhang et al. (2017). Il ritrovamento documenta pertanto la colonizzazione del cuoio da parte della specie, mentre un suo eventuale contributo diretto alla degradazione della matrice di collagene dovrebbe essere verificato sperimentalmente.

Il terzo taxon, *P. elantae*, è stato identificato nel tessuto sintetico dell'ombrellone. Anche per questa specie, gli articoli considerati non forniscono evidenze specifiche di degradazione delle fibre sintetiche. Il ritrovamento appare tuttavia compatibile con la prolungata esposizione del manufatto all'ambiente esterno, che può aver favorito la deposizione di propaguli fungini insieme a polvere, pollini, residui vegetali e altro particolato organico. La presenza di tali depositi sulla superficie può fornire risorse nutritive indipendentemente dalla capacità del fungo di utilizzare direttamente il polimero. A questo proposito, Hammad et al. (2025) hanno confrontato la crescita fungina su materiali tessili differenti, evidenziando come la composizione delle fibre influenzi significativamente la suscettibilità alla colonizzazione. I materiali sintetici analizzati, tra cui poliestere e poliuretano, hanno mostrato complessivamente una maggiore resistenza alla crescita fungina rispetto a substrati quali cotone e camoscio, pur risultando colonizzabili in determinate condizioni (Hammad et al., 2025). La presenza di sporco, finissaggi e sostanze organiche sulla superficie dei tessuti può inoltre fornire fonti di carbonio utilizzabili dai funghi e favorirne lo sviluppo anche quando la fibra stessa risulta scarsamente suscettibile alla degradazione (Hammad et al., 2025). Nel caso dell'ombrellone, è quindi più prudente interpretare il tessuto sintetico principalmente come superficie di deposizione e colonizzazione per *P. elantae*, mentre le sostanze organiche accumulate durante l'esposizione esterna potrebbero aver fornito i nutrienti necessari alla crescita. In assenza di evidenze sperimentali specifiche per questa specie, il suo isolamento non consente di sostenere una degradazione diretta del polimero costitutivo dell'ombrellone.

In conclusione, il recupero di *P. citrinum*, *P. dipodomyicola* e *P. elantae* rispettivamente da cotone, cuoio e materiale sintetico rende *Penicillium* particolarmente significativo nel presente studio, in quanto genere condiviso da tre tipologie di materiale caratterizzate da composizione e condizioni di esposizione differenti. La distribuzione di *Penicillium* nei tre reperti evidenzia quindi soprattutto l'ampia capacità del genere di colonizzare substrati differenti. Allo stesso tempo, il confronto tra le tre specie sottolinea come la semplice presenza dello stesso genere non implichi necessariamente lo stesso meccanismo di biodeterioramento: il significato di ciascun isolamento deve essere interpretato

considerando congiuntamente identità specifica, composizione del materiale, condizioni microambientali e storia di esposizione del reperto.

4.6.8 *Pestalotiopsis*

Il genere *Pestalotiopsis* comprende funghi appartenenti all'ordine Xylariales, frequentemente associati alle piante e caratterizzati da differenti strategie ecologiche, comprendenti forme endofitiche, saprotrofiche e fitopatogene (Russell et al., 2011). La diversità ecologica del genere si accompagna a una notevole variabilità metabolica, che ha suscitato interesse anche per il possibile coinvolgimento di alcuni suoi rappresentanti nella degradazione di substrati complessi e di alcuni polimeri sintetici (Maestri et al., 2023; Russell et al., 2011). Tuttavia, tali capacità non risultano uniformemente distribuite tra le specie né tra i diversi isolati appartenenti al genere, aspetto che richiede cautela nell'interpretazione del potenziale biodeteriogeno di singoli taxa (Russell et al., 2011).

Nel presente studio, quattro isolati recuperati dal tessuto sintetico dell'ombrellone (029-F8, 029-F9, 029-G1 e 029-G3), hanno mostrato mediante analisi molecolare come miglior match *Pestalotiopsis maculiformans*. Il recupero ripetuto dello stesso taxon da un manufatto sottoposto a prolungata esposizione all'ambiente esterno risulta compatibile con l'origine ambientale di *Pestalotiopsis* e con la deposizione di propaguli fungini sulla superficie del tessuto.

Un aspetto particolarmente interessante del genere riguarda la capacità di alcuni suoi rappresentanti di interagire con polimeri sintetici. Russell et al. (2011), analizzando funghi endofitici isolati da piante della foresta amazzonica ecuadoriana, hanno documentato una significativa attività di degradazione del polyester-polyurethane (PUR) in diversi isolati di *Pestalotiopsis*. In particolare, due isolati di *Pestalotiopsis microspora* sono risultati capaci di utilizzare il PUR come unica fonte di carbonio sia in condizioni aerobiche sia anaerobiche (Russell et al., 2011). Gli autori hanno inoltre associato tale attività alla secrezione di una proteina extracellulare riconducibile a una serina-idrolasi, suggerendo il coinvolgimento di un meccanismo enzimatico nella degradazione del polimero (Russell et al., 2011).

La capacità degradativa osservata non risultava però uniforme neppure tra gli isolati di *Pestalotiopsis* analizzati. Russell et al. (2011) hanno infatti distinto isolati altamente attivi, moderatamente attivi e isolati privi di attività rilevabile nei confronti del PUR, evidenziando una marcata variabilità fenotipica all'interno del genere. Questo dato è particolarmente rilevante nell'interpretazione del presente studio, poiché impedisce di trasferire automaticamente a *P. maculiformans* le capacità degradative dimostrate sperimentalmente per *P. microspora* (Russell et al., 2011).

La distinzione tra semplice colonizzazione di una superficie sintetica e reale biodegradazione del polimero è ulteriormente supportata da Brunner et al. (2018). Gli autori hanno isolato numerosi funghi da detriti plastici ambientali e hanno osservato che la presenza del fungo sulla plastica non corrisponde necessariamente alla capacità di degradarla. Nessuno dei ceppi testati è risultato in grado di degradare il polietilene, mentre soltanto un numero limitato di isolati ha mostrato attività nei confronti del poliuretano; nello stesso studio, *P. microspora* è stata utilizzata come specie di riferimento capace di degradare il PU (Brunner et al., 2018). Questi risultati confermano quindi che la colonizzazione fungina di una superficie sintetica non costituisce di per sé una dimostrazione di biodegradazione del materiale (Brunner et al., 2018).

Anche la revisione di Maestri et al. (2023) include *Pestalotiopsis* tra i generi fungini per i quali è stata documentata attività nei confronti dei materiali sintetici. Gli autori indicano esterasi e proteasi tra le principali classi enzimatiche coinvolte nella biodegradazione fungina dei poliuretani e sottolineano come la suscettibilità del materiale dipenda fortemente dalla struttura chimica e dalle proprietà fisiche dello specifico polimero (Maestri et al., 2023). La presenza di legami estere nei materiali sintetici rappresenta, in particolare, uno dei principali punti di attacco enzimatico durante il processo degradativo (Maestri et al., 2023).

Nel caso dell'ombrellone analizzato, il recupero di *P. maculiformans* deve pertanto essere interpretato innanzitutto come evidenza di colonizzazione fungina di una superficie sintetica esposta all'ambiente esterno. La prolungata esposizione agli agenti atmosferici, insieme alla deposizione di polvere, particolato e residui organici, può aver favorito l'insediamento e la crescita fungina indipendentemente dall'utilizzo diretto del polimero come fonte nutritiva. Sebbene il genere *Pestalotiopsis* comprenda isolati dotati di attività degradativa nei confronti delle fibre sintetiche (Brunner et al., 2018; Maestri et al., 2023; Russell et al., 2011), le evidenze considerate non permettono di attribuire specificamente questa capacità a *P. maculiformans*. Un suo eventuale coinvolgimento diretto nel biodeterioramento del tessuto sintetico dell'ombrellone dovrebbe quindi essere verificato mediante specifici saggi degradativi e analisi chimico-strutturali del materiale.

4.6.9 *Stachybotrys*

Il genere *Stachybotrys* comprende funghi filamentosi appartenenti alla famiglia Stachybotryaceae, prevalentemente saprotrofi e frequentemente associati a substrati ricchi di cellulosa e caratterizzati da elevata disponibilità idrica.

Dal punto di vista del biodeterioramento, *Stachybotrys* possiede un ampio repertorio di enzimi extracellulari, tra cui cellulasi, glucanasi, xilanasi, laccasi e proteasi, coinvolti nella degradazione di polisaccaridi strutturali e di altri composti organici complessi. Tali attività enzimatiche possono

contribuire alla perdita delle proprietà meccaniche e alle alterazioni superficiali e cromatiche dei materiali colonizzati, soprattutto in presenza di elevata umidità (Ibrahim et al., 2022). Alcuni studi hanno inoltre riportato un possibile coinvolgimento del genere nella degradazione di materiali plastici, incluso il polietilene a bassa densità, sebbene queste evidenze derivino principalmente da condizioni sperimentali e non consentano di generalizzare tale capacità all'intero genere (Ekanayaka et al., 2022; Ibrahim et al., 2022).

Nel presente lavoro, l'isolato 029-F6, recuperato esclusivamente dall'ombrellone in fibre sintetiche, ha mostrato come miglior match BLAST *Stachybotrys chlorohalonatus*. Nella presente tesi viene mantenuta la denominazione *S. chlorohalonatus* riportata dal database utilizzato per il confronto molecolare; nella letteratura tassonomica consultata, tuttavia, lo stesso taxon è riportato come *Stachybotrys chlorohalonata* (Andersen et al., 2003; Lombard et al., 2016).

L'ecologia documentata per questa specie rende particolarmente interessante il suo recupero dall'ombrellone. Lombard et al. (2016) riportano infatti isolati di *S. chlorohalonata* provenienti da substrati molto differenti, comprendenti materiale vegetale, suolo, carta, cartone, materiale edilizio e, significativamente, anche plastica. Nello stesso lavoro sono inoltre riportati isolati provenienti da fibre vegetali, come il lino, e da differenti materiali cellulosici, evidenziando come la specie possa essere rinvenuta su superfici caratterizzate da composizione molto diversa (Lombard et al., 2016).

Nel caso dell'ombrellone analizzato, proveniente da un ambiente costiero e sottoposto a prolungata esposizione esterna, la colonizzazione può essere stata favorita dalla deposizione sulla superficie di propaguli fungini insieme a sabbia, aerosol marino, polveri, residui vegetali e altro particolato organico. L'alternanza di bagnatura e asciugatura determinata da pioggia, elevata umidità atmosferica e altri agenti meteorici può inoltre aver determinato la formazione di microzone temporaneamente favorevoli alla germinazione delle spore e allo sviluppo del micelio. In tale contesto, il tessuto sintetico potrebbe aver svolto principalmente il ruolo di supporto fisico per la colonizzazione, mentre le risorse nutritive necessarie alla crescita potrebbero essere derivate dal materiale organico accumulato sulla superficie.

Il rinvenimento di *S. chlorohalonatus* appare pertanto maggiormente coerente con una colonizzazione favorita dalle condizioni microambientali del manufatto che con una degradazione diretta delle fibre sintetiche. Sebbene Lombard et al. (2016) riportino anche un isolato di *S. chlorohalonata* proveniente da plastica, tale dato documenta la capacità della specie di essere presente e svilupparsi su questo tipo di superficie, ma non costituisce di per sé una dimostrazione della degradazione del polimero. Nel presente studio, in assenza di saggi degradativi specifici o di analisi chimico-strutturali delle fibre, non è quindi possibile attribuire a *S. chlorohalonatus* un'attività degradativa diretta sul materiale sintetico dell'ombrellone.

In conclusione, il recupero di *S. chlorohalonatus* dall'ombrellone può quindi essere interpretato come il risultato dell'interazione tra l'ampia capacità di dispersione ambientale del genere, la presenza di materiale organico depositato sulla superficie e le condizioni di esposizione del manufatto.

Il dato risulta particolarmente interessante perché amplia, nel contesto del presente studio, il quadro dei taxa fungini capaci di colonizzare superfici sintetiche sottoposte a esposizione ambientale prolungata, senza tuttavia consentire di attribuire alla specie un ruolo diretto nel processo di biodegradazione del polimero.

4.6.10 *Trichoderma*

Il genere *Trichoderma* comprende funghi filamentosi appartenenti agli Ascomycota, ampiamente distribuiti nel suolo, nella rizosfera e nei materiali vegetali in decomposizione. La rapida crescita del micelio, la produzione di metaboliti secondari e l'elevata versatilità metabolica consentono alle specie del genere di colonizzare substrati differenti e di partecipare attivamente alla decomposizione della sostanza organica (Schuster & Schmoll, 2010).

Un ruolo centrale è svolto dalla produzione di enzimi extracellulari, tra cui cellulasi, emicellulasi, β -glucanasi e xilanasi, coinvolti nella degradazione dei polisaccaridi strutturali. L'elevata attività cellulolitica del genere trova applicazione anche nell'industria tessile, dove le cellulasi prodotte in particolare da *T. reesei* vengono utilizzate nel biopolishing e nel trattamento del denim (Miettinen-Oinonen & Suominen, 2002).

Nel presente studio, *Trichoderma* è risultato particolarmente rappresentato nella camicia di cotone, dalla quale sono stati recuperati otto isolati attribuiti molecularmente a quattro specie differenti. L'isolato 029-E5 ha mostrato come miglior match *Trichoderma koningiopsis*, con query cover del 100% e identità del 99,67%; gli isolati 029-E6, 029-E7, 029-E8 e 029-F1 sono risultati riconducibili a *T. longibrachiatum*; l'isolato 029-F2 ha mostrato come miglior corrispondenza *T. erinaceum* mentre gli isolati 029-E9 e 029-F3 hanno mostrato come miglior match *Hypocrea koningii*, denominazione storica corrispondente all'attuale *Trichoderma koningii*.

La presenza contemporanea di più specie di *Trichoderma* appare coerente sia con il precedente interrimento della camicia, che può aver favorito il trasferimento di propaguli dal suolo, sia con la natura cellulosica del substrato. La successiva conservazione del reperto nella stessa busta di plastica può inoltre aver determinato un microambiente confinato, caratterizzato da ritenzione dell'umidità e ridotta ventilazione, potenzialmente favorevole alla germinazione delle spore e allo sviluppo del micelio.

Per *T. koningiopsis* sono disponibili evidenze sperimentali specifiche della capacità cellulolitica. Castrillo et al. (2015) hanno dimostrato la secrezione di endo-1,4- β -glucanasi da parte della specie

utilizzando sia carbossimetilcellulosa sia segatura di pino come fonti di carbonio, osservando una maggiore produzione enzimatica sul substrato lignocellulosico (M. Castrillo et al., 2015). Successivamente, Castrillo et al. (2017) hanno descritto il ceppo POS7 come un efficace produttore di cellulasi, caratterizzato da un'elevata secrezione enzimatica in fermentazione allo stato solido. Tali caratteristiche risultano coerenti con il recupero della specie da un materiale costituito prevalentemente da cellulosa, pur non dimostrando che l'isolato presente sulla camicia abbia direttamente contribuito alla degradazione osservata (M. L. Castrillo et al., 2017).

T. longibrachiatum è risultato la specie maggiormente rappresentata tra gli isolati di *Trichoderma* della camicia, essendo stata identificata in quattro isolati. Anche per questa specie è ben documentata la produzione di enzimi coinvolti nella degradazione della cellulosa.

Kalra et al. (1986) hanno descritto la produzione di un complesso cellulolitico extracellulare da parte di *T. longibrachiatum*, comprendente differenti attività enzimatiche coinvolte nell'idrolisi del polimero cellulosico (Kalra et al. 1986). Preparazioni enzimatiche ottenute da *T. longibrachiatum* comprendono inoltre endo-1,4- β -glucanasi, cellobioidrolasi, β -glucosidasi e β -glucanasi, capaci di idrolizzare i legami β -1,4 dei polisaccaridi cellulosici. La consistente rappresentazione della specie sulla camicia risulta quindi biologicamente compatibile con la disponibilità di un substrato ricco in cellulosa, pur non consentendo di stabilire un rapporto causale con il deterioramento del reperto.

Particolare interesse assume anche *T. koningii*. Dal punto di vista del biodeterioramento, l'associazione di *T. koningii* con la camicia è particolarmente interessante per la capacità cellulolitica documentata sperimentalmente. Wood e McCrae (1978) hanno valutato direttamente l'azione di componenti cellulolitiche di *T. koningii* sulle fibre di cotone, osservando modificazioni della fibra e una diminuzione della resistenza meccanica, con perdite di resistenza alla trazione che, per alcune componenti enzimatiche, raggiungevano il 44% dopo 96 ore di trattamento (Wood & McCrae, 1978). Gli autori hanno inoltre evidenziato l'azione sinergica tra endoglucanasi e cellobioidrolasi nella solubilizzazione della cellulosa del cotone (Wood & McCrae, 1978). Il recupero di *T. koningii* dai brandelli della camicia risulta quindi compatibile con un possibile coinvolgimento nei processi di alterazione della matrice cellulosica, senza tuttavia consentire di attribuire alla specie la frammentazione osservata.

Anche *T. erinaceum* presenta caratteristiche metaboliche pertinenti alla natura cellulosica della camicia. De Assis et al. (2024), attraverso un approccio integrato di genomica, trascrittomica e analisi del secretoma, hanno dimostrato che la specie possiede un ampio repertorio di enzimi coinvolti nella degradazione della parete cellulare vegetale.

In presenza di cellulosa microcristallina e biomasse lignocellulosiche, *T. erinaceum* ha mostrato l'espressione di geni associati alla degradazione della lignocellulosa e la secrezione di numerosi

enzimi attivi sui carboidrati, tra cui una β -glucosidasi caratterizzata da elevata attività nei confronti del cellobiosio (De Assis et al., 2024). Tali evidenze confermano il potenziale cellulolitico della specie e rendono il suo recupero dalla camicia coerente con la disponibilità di un substrato ricco in cellulosa.

Una situazione differente è stata osservata nel copridivano sintetico, dal quale gli isolati 033-G2 e 033-G4 sono stati identificati come *T. harzianum*.

La specie possiede un articolato sistema enzimatico extracellulare: analisi secretomiche hanno evidenziato numerose glicoside-idrolasi, comprese endoglucanasi, xilanasi, xilosidasi e glucanasi coinvolte nella degradazione di polisaccaridi complessi (Do Vale et al., 2012). La capacità cellulolitica è stata ulteriormente documentata attraverso la produzione di endoglucanasi, esoglucanasi e β -glucosidasi e la crescita su substrati ricchi di cellulosa (Ali et al., 2026). Queste proprietà non costituiscono tuttavia una dimostrazione della capacità di degradare le fibre sintetiche del copridivano.

Il campione proveniva, infatti, da una cantina caratterizzata da elevata umidità, ridotta ventilazione, assenza di luce naturale e accumulo di polvere e materiale organico, condizioni potenzialmente favorevoli alla colonizzazione fungina. Il tessuto sintetico potrebbe quindi aver rappresentato principalmente un supporto fisico, mentre i nutrienti necessari alla crescita potrebbero essere stati forniti dai depositi organici superficiali. Alcune evidenze sperimentali suggeriscono che *T. harzianum* possa contribuire, in determinate condizioni, all'alterazione del polietilene a bassa densità (Ahmed et al., 2025); tale capacità non può tuttavia essere automaticamente trasferita agli isolati o allo specifico materiale analizzato nel presente lavoro.

In conclusione, il recupero di *T. koningiopsis*, *T. longibrachiatum*, *T. koningii* e *T. erinaceum* dalla camicia appare coerente con la precedente esposizione al suolo, con le condizioni di conservazione successive e con la natura cellulosica del cotone. Le evidenze disponibili per queste specie documentano differenti componenti del sistema cellulolitico e, nel caso di *T. koningii*, anche effetti sperimentali diretti sulle proprietà meccaniche delle fibre di cotone (M. Castrillo et al., 2015; M. L. Castrillo et al., 2017; De Assis et al., 2024; Wood & McCrae, 1978).

Nel copridivano, invece, il recupero di *T. harzianum* deve essere interpretato più prudentemente come colonizzazione di una superficie sintetica in condizioni microambientali favorevoli. In entrambi i reperti, l'isolamento documenta la presenza e la crescita dei funghi sul materiale, mentre l'attribuzione di un ruolo causale nel deterioramento richiederebbe analisi chimiche, strutturali e meccaniche specifiche delle fibre.

4.7 Interpretazione integrata dei risultati e implicazioni forensi

L'interpretazione dei risultati ottenuti nello studio del biodeterioramento fungino non può limitarsi all'identificazione dei singoli taxa, ma richiede una valutazione integrata che consideri contemporaneamente la natura del substrato, le condizioni ambientali di esposizione e le caratteristiche ecologiche dei microrganismi isolati.

In ambito forense, infatti, i materiali tessili non rappresentano semplici supporti passivi, bensì superfici dinamiche sulle quali possono avvenire processi di trasferimento, selezione e persistenza delle comunità microbiche. Secondo il principio di interscambio di Locard, ogni contatto tra individuo, oggetto e ambiente determina uno scambio reciproco di tracce; in tale prospettiva, anche il microbioma associato ai materiali tessili può costituire una fonte di informazioni utile per la ricostruzione della storia post-deposizionale di un campione.

Recenti studi hanno evidenziato come gli indumenti acquisiscano progressivamente comunità microbiche derivanti sia dall'utilizzatore sia dall'ambiente circostante e come la composizione di tali comunità sia influenzata dalle caratteristiche del tessuto, dalle condizioni di esposizione e dalla durata della permanenza nell'ambiente. Il profilo microbiologico di un campione tessile può quindi contribuire all'interpretazione delle modalità di esposizione, conservazione e trasferimento del materiale, integrando le tradizionali evidenze forensi con informazioni di natura ecologica e microbiologica.

Nel presente lavoro, l'identificazione di differenti taxa fungini su campioni costituiti da cotone, cuoio e fibre sintetiche ha evidenziato come la composizione delle comunità micologiche rifletta l'interazione tra proprietà intrinseche del materiale, disponibilità di nutrienti e condizioni microambientali. I singoli isolamenti non devono pertanto essere interpretati come eventi indipendenti, ma come componenti di un quadro ecologico complesso, nel quale il significato di ciascun taxon dipende dalla sua associazione con il substrato, dalla localizzazione sul campione e dalla contemporanea presenza degli altri microrganismi. Alla luce di questa impostazione, il valore forense dei risultati non risiede nella presenza di un singolo genere o di una singola specie, spesso caratterizzati da ampia distribuzione ambientale, ma nella lettura congiunta della composizione della comunità fungina, delle caratteristiche del materiale e della storia di esposizione del campione.

L'analisi integrata consente quindi di valutare la compatibilità tra il profilo micologico osservato e specifiche condizioni microambientali, fornendo elementi utili alla ricostruzione dei processi di colonizzazione, conservazione e trasformazione post-deposizionale dei materiali tessili.

4.7.1 Influenza del substrato e del microambiente

L'analisi complessiva dei risultati evidenzia come la diversa distribuzione dei taxa fungini nei quattro campioni non possa essere spiegata considerando esclusivamente la natura del substrato. Al contrario, la composizione delle comunità fungine osservate appare il risultato dell'interazione tra le proprietà chimico-fisiche del materiale, le condizioni microambientali e la storia conservativa di ciascun campione.

Il biodeterioramento rappresenta infatti un processo multifattoriale, nel quale disponibilità di nutrienti, umidità, temperatura, ventilazione e accumulo di sostanza organica influenzano sia la germinazione delle spore sia il successivo sviluppo del micelio, determinando una selezione differenziale dei microrganismi in funzione delle caratteristiche dell'ambiente.

Il confronto tra i campioni mostra chiaramente come il substrato costituisca un primo fattore selettivo. La camicia di cotone, essendo costituita prevalentemente da cellulosa, rappresenta una matrice direttamente utilizzabile da numerosi funghi cellulolitici. La presenza di generi quali *Humicola*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Trichoderma* risulta quindi coerente con la capacità di questi microrganismi di produrre complessi enzimatici costituiti da endoglucanasi, esoglucanasi e β -glucosidasi, responsabili dell'idrolisi della cellulosa e dell'utilizzo delle fibre vegetali come fonte di carbonio (Kuhad et al., 2011).

Diversamente, la cintura di cuoio, caratterizzata da una matrice di collagene stabilizzata mediante concia, ha ospitato una comunità fungina differente. Sebbene il processo di concia aumenti la resistenza del materiale al deterioramento biologico, il cuoio mantiene una suscettibilità alla colonizzazione quando viene conservato in ambienti favorevoli allo sviluppo fungino, nei quali collagene, lipidi residui e altri composti organici possono costituire una fonte nutritiva per numerosi microrganismi (Ba et al., 2023).

Una situazione ancora diversa è stata osservata nei due materiali sintetici, costituiti dal tessuto del copridivano e dall'ombrellone. Nonostante entrambi siano composti da fibre sintetiche, le comunità fungine isolate non sono risultate sovrapponibili, evidenziando come la natura del polimero, da sola, non sia sufficiente a spiegare la composizione della micobiota. Nei materiali sintetici il substrato ha probabilmente svolto prevalentemente il ruolo di supporto fisico per la colonizzazione, mentre lo sviluppo fungino è stato favorito dalla presenza di polveri, residui organici, biofilm e altre sostanze depositate sulla superficie, che hanno rappresentato la reale fonte di nutrienti per i microrganismi. Sebbene alcune specie fungine siano state descritte come potenziali degradatrici di specifici polimeri sintetici, tali processi risultano generalmente lenti e dipendono dalle caratteristiche chimico-fisiche del materiale e dalle condizioni ambientali (Srikanth et al., 2022).

L'analisi dei risultati mette inoltre in evidenza il ruolo determinante del microambiente nella selezione delle comunità fungine. I quattro campioni presentavano infatti storie conservative profondamente differenti: la camicia è stata inizialmente inserita all'interno di una busta di plastica, interrata e successivamente conservata nella stessa busta, favorendo il mantenimento di un microambiente umido; il copridivano proveniva da una cantina privata caratterizzata da elevata umidità, ridotta ventilazione e limitata illuminazione; la cintura era conservata in un armadio domestico, mentre l'ombrellone è rimasto esposto a lungo all'ambiente costiero della spiaggia di Castiglione della Pescaia, dove aerosol marino, sabbia e residui organici hanno probabilmente influenzato la composizione della comunità fungina. Queste differenti condizioni ambientali hanno verosimilmente esercitato una pressione selettiva almeno pari a quella esercitata dal substrato stesso, confermando come disponibilità d'acqua, ventilazione, temperatura e presenza di nutrienti rappresentino i principali fattori che regolano l'instaurarsi e l'evoluzione delle comunità fungine sui materiali organici e antropici (Ba et al., 2023; Sterflinger & Pinzari, 2012).

Particolarmente significativo è il comportamento di alcuni generi, quali *Penicillium* e *Trichoderma*, isolati da campioni costituiti da materiali profondamente differenti. La loro presenza sia su substrati naturali sia su materiali sintetici evidenzia un'elevata plasticità ecologica e suggerisce che la loro distribuzione sia influenzata soprattutto dalla capacità di adattarsi a differenti condizioni ambientali piuttosto che dalla sola composizione del materiale. Al contrario, taxa quali *Humicola*, *Alternaria infectoria* o *Stachybotrys* hanno mostrato una distribuzione maggiormente associata a specifiche caratteristiche del substrato o del microambiente, indicando una maggiore selettività ecologica. Ciò dimostra come ogni campione costituisca un vero e proprio microecosistema, nel quale la comunità fungina deriva dalla continua interazione tra proprietà del materiale, condizioni ambientali e dinamiche ecologiche proprie di ciascun taxon.

Nel complesso, i risultati ottenuti dimostrano che la composizione delle comunità fungine non riflette esclusivamente la natura del materiale, ma rappresenta l'esito dell'interazione tra substrato, microambiente e storia post-deposizionale del campione. Da una prospettiva forense, questa osservazione assume particolare rilevanza, poiché evidenzia come il valore investigativo dei dati micologici non risieda nella presenza di un singolo fungo, bensì nell'interpretazione dell'intera comunità fungina alla luce del contesto ambientale e conservativo del campione. L'identificazione dei singoli taxa acquisisce pertanto significato solo quando viene inserita in un quadro ecologico complessivo, contribuendo alla ricostruzione della storia di esposizione, conservazione e possibile trasferimento del materiale analizzato (Ba et al., 2023; Sterflinger & Pinzari, 2012).

4.7.2 Colonizzazione superficiale e degradazione diretta

Uno degli aspetti più rilevanti nell'interpretazione dei risultati ottenuti riguarda la distinzione tra colonizzazione superficiale e degradazione diretta del materiale. Sebbene questi termini vengano frequentemente utilizzati come sinonimi, essi descrivono fenomeni differenti e non necessariamente concomitanti.

Il biodeterioramento comprende infatti qualsiasi alterazione indesiderata delle proprietà di un materiale causata dall'attività di organismi viventi e può manifestarsi con semplici modificazioni estetiche, quali scolorimenti e macchie, fino alla completa distruzione della matrice attraverso meccanismi fisici e biochimici.

Diversamente, il termine biodegradazione dovrebbe essere riservato ai casi in cui i microrganismi utilizzano direttamente la matrice organica del materiale come fonte di carbonio ed energia, determinandone una reale modificazione strutturale. Anche il biofouling, inteso come semplice crescita di organismi sulla superficie di un materiale, può verificarsi indipendentemente dalla presenza di un'effettiva degradazione del substrato (Gadd et al., 2024).

Alla luce di tali definizioni, il recupero di un fungo vitale da un campione tessile non costituisce, di per sé, una dimostrazione della degradazione della matrice. L'isolamento colturale e l'identificazione morfologica e/o molecolare consentono infatti di documentare la presenza di microrganismi metabolicamente attivi, ma non permettono di stabilire se essi stessero realmente utilizzando il materiale come fonte di nutrienti oppure se stessero semplicemente colonizzando sostanze organiche depositate sulla superficie. La conferma del biodeterioramento richiede quindi un approccio integrato che combini osservazioni macroscopiche e microscopiche con analisi strutturali, chimiche e molecolari. Inoltre, le tecniche colturali recuperano soltanto una parte della comunità microbica realmente presente sul materiale e i microrganismi isolati non coincidono necessariamente con quelli responsabili delle alterazioni osservate, rendendo necessaria una valutazione critica dei risultati ottenuti (Gadd et al., 2024). Questa impostazione è confermata anche dagli studi sperimentali dedicati ai materiali tessili. La dimostrazione della degradazione della cellulosa viene infatti generalmente ottenuta attraverso l'integrazione di differenti metodiche analitiche, tra cui microscopia elettronica a scansione (SEM), spettroscopia FTIR, spettroscopia Raman, diffrazione ai raggi X (XRD), prove meccaniche di trazione, valutazione della perdita di massa e analisi della cristallinità delle fibre. Tali tecniche consentono di evidenziare erosione della superficie, depolimerizzazione della cellulosa, modificazioni della struttura molecolare e riduzione delle proprietà meccaniche del materiale, fornendo prove dirette dell'effettiva degradazione della matrice e non della sola presenza dei microrganismi (Elamin et al., 2018; Kavkler et al., 2011, 2015).

La sola presenza di un fungo su un materiale tessile non implica necessariamente un'attività degradativa. Accanto ai funghi cellulolitici, infatti, numerose specie non cellulolitiche possono svilupparsi sfruttando amido, sporco superficiale, oli o altri residui organici presenti sul tessuto, causando pigmentazioni, macchie o penetrazione del micelio senza determinare una reale perdita di resistenza della fibra. In questi casi il fungo utilizza sostanze presenti sulla superficie del materiale piuttosto che la matrice strutturale del tessuto, rendendo improprio attribuire automaticamente il deterioramento osservato all'attività degradativa del microrganismo (Montegut et al., 1991).

Un principio analogo trova applicazione anche nello studio dei polimeri sintetici. Sebbene numerosi microrganismi siano stati descritti come potenziali degradatori di plastiche e altri materiali polimerici, la biodegradazione rappresenta un processo complesso che richiede la dimostrazione sperimentale dell'utilizzo del polimero come fonte di carbonio. A tale scopo vengono generalmente impiegate analisi della perdita di massa, produzione di CO₂, consumo di ossigeno, caratterizzazione dei prodotti di degradazione, osservazioni mediante SEM, spettroscopia FTIR, determinazione delle proprietà meccaniche e valutazione delle variazioni della cristallinità del materiale (Arutchelvi et al., 2008). Nel presente studio è stato possibile dimostrare con certezza la colonizzazione fungina dei campioni attraverso l'isolamento colturale e la successiva identificazione morfologica e molecolare degli isolati. Tuttavia, non sono state eseguite analisi specificamente finalizzate a documentare alterazioni strutturali della matrice, quali SEM, FTIR, Raman, XRD, prove meccaniche, determinazione della perdita di massa o saggi di attività enzimatica. Pertanto, sebbene la presenza di generi noti per la produzione di enzimi degradativi renda biologicamente plausibile un loro coinvolgimento nei processi di alterazione dei materiali, i dati ottenuti non consentono di attribuire con certezza la degradazione della matrice ai singoli taxa isolati.

Questa considerazione assume particolare rilevanza per i materiali sintetici analizzati nel presente lavoro. L'isolamento di *Curvularia*, *Stachybotrys*, *Fusarium*, *Trichoderma* e di un rappresentante della classe Sordariomycetes dal tessuto del copridivano e dall'ombrellone dimostra la capacità di questi microrganismi di colonizzare tali superfici, ma non costituisce una prova della biodegradazione diretta del polimero. Alla luce delle caratteristiche ecologiche dei taxa identificati e delle condizioni di rinvenimento dei campioni, risulta più plausibile che tali funghi abbiano sfruttato il film di sostanza organica, i biofilm e il particolato depositati sulla superficie dei materiali come fonte di nutrienti, utilizzando il substrato sintetico prevalentemente come supporto fisico per la crescita (Arutchelvi et al., 2008; Gadd et al., 2024).

Diversamente, per la camicia di cotone, costituita prevalentemente da cellulosa, la presenza di generi quali *Humicola*, *Trichoderma*, *Fusarium* e *Penicillium* risulta maggiormente compatibile con un

potenziale coinvolgimento nei processi degradativi della matrice, pur in assenza delle evidenze sperimentali necessarie per dimostrarlo in maniera definitiva.

Anche per quanto riguarda il cuoio, è necessario distinguere tra colonizzazione e degradazione diretta. Il cuoio è costituito prevalentemente da collagene, una proteina che, nonostante il processo di concia ne aumenti la stabilità chimico-fisica e la resistenza al deterioramento biologico, può essere comunque interessata da fenomeni di biodeterioramento in presenza di condizioni ambientali favorevoli. La degradazione della matrice di collagene richiede infatti la produzione di specifici enzimi proteolitici, quali collagenasi e altre proteasi extracellulari, e può essere dimostrata solo attraverso evidenze sperimentali che documentino alterazioni della struttura del collagene, perdita delle proprietà meccaniche o modificazioni morfologiche del materiale (Ba et al., 2023; Gadd et al., 2024). Nel presente studio, il recupero di *Cladosporium*, *Penicillium* e *Alternaria infectoria* dalla cintura di cuoio dimostra la capacità di questi microrganismi di colonizzare la superficie del campione, ma non consente di stabilire se essi abbiano effettivamente degradato la matrice di collagene. È pertanto più corretto interpretare tali risultati come espressione di una colonizzazione associata al biodeterioramento, favorita dalle condizioni di conservazione del campione e dalla disponibilità di umidità e sostanza organica superficiale, piuttosto che come prova di una biodegradazione diretta del cuoio. Tale approccio, pienamente coerente con la letteratura più recente, permette di attribuire ai risultati il corretto significato scientifico, distinguendo ciò che è stato effettivamente dimostrato sperimentalmente da quanto, sulla base delle caratteristiche biologiche dei taxa isolati, può essere considerato soltanto una plausibile interpretazione biologica (Gadd et al., 2024b; Kavkler et al., 2015).

4.7.3 Interpretazione forense delle comunità fungine associate ai campioni

Nel presente studio, nessuno dei generi o delle specie fungine identificati può essere considerato singolarmente un indicatore univoco di uno specifico ambiente o di una determinata storia conservativa. Numerosi taxa recuperati, tra cui *Alternaria*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma* e *Mucor*, presentano infatti un'ampia distribuzione ecologica e possono essere rinvenuti nel suolo, nell'aria, sui residui vegetali e negli ambienti indoor (Hawksworth & Wiltshire, 2015; Morin-Sardin et al., 2017; Woudenberg et al., 2013). La loro presenza isolata possiede pertanto un limitato valore discriminante, mentre maggiore interesse assume l'interpretazione complessiva del profilo fungino nel contesto del substrato e della storia ambientale del reperto (Harper & Moody, 2023b; Karadayı, 2021; Warnasuriya et al., 2023).

La composizione fungina associata a un materiale deriva, infatti, dall'interazione tra dispersione dei propaguli e selezione esercitata dal microambiente. La deposizione di una spora non implica

necessariamente una colonizzazione attiva: disponibilità d'acqua, temperatura, ventilazione, caratteristiche chimico-fisiche del substrato e presenza di nutrienti condizionano la germinazione e la successiva persistenza dei microrganismi (Peay et al., 2016; Sterflinger & Pinzari, 2012).

Le comunità osservate rappresentano quindi il risultato combinato della disponibilità locale dei propaguli, del filtraggio ambientale e delle caratteristiche del substrato (Bahram et al., 2018; Peay et al., 2016). In ambito forense, tale principio suggerisce che l'informazione maggiormente utile non risieda nella presenza di una singola specie, ma nella combinazione dei taxa, nella loro distribuzione spaziale e nella compatibilità del profilo complessivo con le condizioni di esposizione documentate (Harper & Moody, 2023b; Warnasuriya et al., 2023).

Nel caso della camicia di cotone, il profilo degli isolati comprendeva *Humicola fuscoatra*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium citrinum* e diverse specie di *Trichoderma*, tra cui *T. koningiopsis*, *T. longibrachiatum*, *T. erinaceum* e *T. koningii*. La permanenza nel terreno ha potuto esporre il tessuto a propaguli provenienti dal suolo e dalla materia organica, mentre la successiva conservazione nella stessa busta di plastica ha determinato un microambiente differente, caratterizzato da ridotti scambi con l'esterno e dalla possibile persistenza dell'umidità trattenuta dal tessuto (Sterflinger & Pinzari, 2012). Particolarmente rilevante, in prospettiva forense, è risultata la distribuzione spaziale degli isolati: taxa differenti sono stati recuperati dal colletto, dai frammenti di tessuto e dalla superficie interna della busta. Ciò evidenzia come un reperto tessile possa essere costituito da microhabitat differenti e sottolinea l'utilità di un campionamento localizzato, anziché limitato a una singola porzione del manufatto. Il recupero di componenti fungine anche dalla superficie interna del contenitore suggerisce inoltre che oggetto e involucro possano condividere parte della stessa storia conservativa, pur non consentendo di stabilire la direzione del trasferimento dei propaguli (Karadayı, 2021; Warnasuriya et al., 2023).

La cintura di cuoio, conservata per un periodo prolungato in un armadio domestico, ha restituito *Cladosporium halotolerans*, *C. eucommiae*, *Alternaria infectoria* e *Penicillium dipodomyicola*. La presenza di taxa appartenenti a generi frequentemente rilevati negli ambienti indoor risulta compatibile con un contesto domestico, ma non rappresenta una firma specifica di tale ambiente (Adams et al., 2013; Warnasuriya et al., 2023). In questo campione assume maggiore interesse la possibilità di distinguere superficie esterna, interna e spessore del materiale. L'analisi separata di porzioni caratterizzate da diversa esposizione potrebbe infatti contribuire, in studi futuri, a distinguere una contaminazione prevalentemente superficiale da una colonizzazione più persistente del manufatto. Nel presente lavoro, tuttavia, il numero limitato di isolati non consente di ricostruire con precisione tali dinamiche.

Il copridivano sintetico, proveniente da una cantina caratterizzata da elevata umidità e scarso ricambio d'aria, ha restituito *Trichoderma harzianum* e *Mucor circinelloides*. Entrambi appartengono a gruppi caratterizzati da ampia distribuzione ambientale e rapida capacità di colonizzazione in presenza di condizioni favorevoli (Morin-Sardin et al., 2017; Walther et al., 2019). In questo caso, la natura sintetica del supporto richiede particolare cautela: la presenza fungina non dimostra una degradazione diretta del polimero e può essere sostenuta dalla polvere e dalla sostanza organica depositate sulla superficie. Il profilo osservato può, quindi, essere considerato compatibile con un ambiente indoor umido e scarsamente ventilato, ma non diagnostico di una specifica cantina. In ambito investigativo, la sua utilità aumenterebbe attraverso il confronto con campioni ambientali provenienti dal luogo ipotizzato, principio alla base di molti approcci microbiologici di tipo associativo (Harper & Moody, 2023b; Karadayı, 2021).

L'ombrellone sintetico ha mostrato il profilo tassonomicamente più eterogeneo tra gli isolati recuperati, comprendendo *Stachybotrys chlorohalonatus*, *Fusarium acuminatum*, *Pestalotiopsis maculiformans*, *Curvularia pseudolunata*, *Penicillium elantae* e *Alternaria brassicae*. La prolungata esposizione in ambiente costiero ha sottoposto il tessuto a continue fonti di propaguli aerodispersi e a deposizione di particolato, residui vegetali e aerosol, oltre a ripetuti cicli di bagnamento e asciugatura. La presenza contemporanea di taxa con differenti affinità ecologiche appare pertanto compatibile con una superficie outdoor esposta nel tempo a molteplici sorgenti ambientali (Adams et al., 2013; Peay et al., 2016). Tale profilo non costituisce tuttavia una firma geografica esclusiva del luogo di provenienza. Inoltre, la maggiore ricchezza osservata deve essere interpretata con cautela, poiché le superfici e le modalità di campionamento non erano uniformi tra i quattro reperti.

Il confronto tra copridivano e ombrellone risulta particolarmente informativo: pur essendo entrambi costituiti da materiale sintetico, hanno restituito profili fungini nettamente differenti. Il primo proveniva da un ambiente indoor umido e confinato, mentre il secondo era stato sottoposto a esposizione outdoor prolungata. Tale differenza suggerisce che il microambiente e la storia di esposizione possano esercitare un'importante influenza sulla componente fungina recuperata anche quando la natura generale del substrato è simile (Bahram et al., 2018; Peay et al., 2016). Al contrario, la presenza di generi come *Trichoderma* o *Penicillium* su materiali differenti conferma il ridotto valore discriminante attribuibile a un singolo taxon.

Da un punto di vista forense, i risultati supportano quindi un approccio basato sulla compatibilità ecologica del profilo micologico complessivo piuttosto che sulla ricerca di specie indicatrici assolute. La distribuzione dei taxa, la loro associazione reciproca, il substrato sul quale vengono recuperati e le condizioni microambientali costituiscono informazioni potenzialmente complementari per ricostruire la storia post-deposizionale di un reperto. Il confronto tra profili fungini di campioni

incogniti e campioni ambientali di riferimento potrebbe, in prospettiva, contribuire alla valutazione dell'associazione tra un manufatto e un ambiente, alla distinzione tra condizioni indoor e outdoor o all'identificazione di cambiamenti legati a interrimento, confinamento o trasferimento (Harper & Moody, 2023b; Hawksworth & Wiltshire, 2015; Karadayı, 2021; Warnasuriya et al., 2023).

Tale potenziale deve tuttavia essere interpretato alla luce dei limiti dello studio. Il campionamento non era uniforme tra i reperti e l'approccio *culture-dependent* ha consentito di caratterizzare esclusivamente la componente vitale e coltivabile recuperabile nelle condizioni sperimentali adottate, senza descrivere in modo esaustivo l'intera comunità fungina presente (Li et al., 2012). Inoltre, l'ampia distribuzione ecologica di molti dei taxa identificati impedisce di attribuire alle singole presenze un valore geografico o ambientale esclusivo. I risultati devono pertanto essere considerati descrittivi ed esplorativi e integrati con informazioni contestuali e altre evidenze forensi.

In conclusione, in ambito forense, l'analisi della componente fungina associata a un materiale tessile può contribuire a rispondere a una domanda di compatibilità: il profilo micologico osservato è coerente con le condizioni di esposizione, permanenza o conservazione ipotizzate per il reperto? Il valore investigativo non risiede pertanto nell'individuazione di una specie indicatrice esclusiva, ma nella valutazione integrata della composizione fungina, della sua distribuzione sul campione, delle caratteristiche del substrato e del microambiente. In presenza di campioni ambientali di riferimento, tale approccio potrebbe inoltre contribuire a valutare la compatibilità tra un reperto e un determinato ambiente o a evidenziare cambiamenti nella sua storia post-deposizionale, quali interrimento, trasferimento, confinamento o passaggio tra condizioni indoor e outdoor (Harper & Moody, 2023a; Hawksworth & Wiltshire, 2015; Karadayı, 2021; Warnasuriya et al., 2023).

4.8 Limiti dello studio e prospettive future nella caratterizzazione del biodeterioramento fungino dei materiali tessili

Il presente studio ha consentito di caratterizzare le comunità fungine associate a campioni tessili costituiti da materiali differenti e sottoposti a diverse condizioni di esposizione ambientale, evidenziando come la composizione della comunità micologica rappresenti il risultato dell'interazione tra substrato, microambiente e disponibilità di nutrienti.

Nonostante ciò, alcuni limiti metodologici devono essere considerati nell'interpretazione dei risultati e rappresentano, al tempo stesso, importanti prospettive per futuri sviluppi della ricerca nel campo del biodeterioramento fungino applicato ai materiali tessili.

Un primo limite riguarda la natura osservazionale dello studio. I campioni analizzati presentavano, infatti, differenti storie conservative, differenti condizioni di esposizione e differenti caratteristiche chimico-fisiche, rendendo difficile distinguere quantitativamente il contributo esercitato dal materiale

rispetto a quello delle condizioni ambientali. La colonizzazione fungina osservata rappresenta quindi il risultato di un processo ecologico complesso, nel quale proprietà del substrato, umidità, ventilazione, disponibilità di acqua e sostanza organica agiscono simultaneamente selezionando comunità fungine differenti. Di conseguenza, le differenze riscontrate tra i quattro campioni non possono essere attribuite esclusivamente alla natura del materiale, ma devono essere interpretate come il risultato dell'interazione tra numerosi fattori biologici e ambientali.

Un secondo limite riguarda l'identificazione tassonomica degli isolati. Nel presente lavoro l'identificazione è stata ottenuta mediante integrazione tra osservazioni morfologiche e sequenziamento della regione ITS, mentre nel caso dei Mucorales è stato possibile raggiungere soltanto un'identificazione morfologica. Sebbene l'ITS rappresenti il barcode molecolare ufficialmente riconosciuto per l'identificazione delle specie fungine, nessun singolo marcatore genetico è universalmente risolutivo per tutti i gruppi tassonomici. Inoltre, l'identificazione basata esclusivamente sulla morfologia può risultare problematica a causa della plasticità fenotipica, della presenza di specie criptiche e della notevole variabilità delle strutture riproduttive osservabili in coltura. Per questo motivo, l'approccio oggi considerato più affidabile consiste nell'integrare i caratteri morfologici con dati molecolari, utilizzando, quando necessario, ulteriori marcatori filogenetici oltre alla regione ITS e confrontando le sequenze con database accuratamente curati (Raja et al., 2017).

Un ulteriore limite riguarda l'approccio colturale adottato per l'isolamento dei microrganismi. Le tecniche di coltivazione permettono infatti di recuperare esclusivamente la frazione vitale e coltivabile della comunità fungina, mentre numerose specie possono rimanere non rilevate a causa delle loro specifiche esigenze nutrizionali o della competizione esercitata da microrganismi caratterizzati da una crescita più rapida. Pertanto, la comunità fungina ottenuta mediante isolamento non coincide necessariamente con l'intera comunità presente sul campione, ma rappresenta soltanto la porzione selezionata dalle condizioni di coltura impiegate. Sebbene tale approccio sia fondamentale per ottenere colture pure, identificare gli isolati e conservarli in collezione microbiologica, esso dovrebbe essere integrato con metodiche molecolari indipendenti dalla coltivazione, al fine di ottenere una rappresentazione più completa della biodiversità fungina associata ai materiali tessili (Raja et al., 2017).

Nel presente lavoro, soprattutto per i materiali sintetici, è quindi possibile affermare con sicurezza la presenza di una colonizzazione fungina vitale, mentre l'effettiva degradazione del polimero deve essere interpretata con cautela. La letteratura dimostra infatti che la conferma del biodeterioramento richiede un approccio multiparametrico capace di documentare le modificazioni chimiche, fisiche e meccaniche del materiale. Kavkler et al. (2015), studiando il deterioramento fungino di tessuti di

cotone, hanno dimostrato come la combinazione di microscopia elettronica a scansione (SEM), spettroscopia Raman, spettroscopia FTIR e prove meccaniche permetta di evidenziare fenomeni quali depolimerizzazione della cellulosa, perdita di ordine molecolare, idrolisi delle fibre e riduzione della resistenza meccanica del tessuto. Analogamente, Elamin et al. (2018) hanno evidenziato come l'integrazione tra microscopia ottica, SEM, FTIR, diffrazione ai raggi X (XRD) e determinazione della viscosità intrinseca consenta di valutare quantitativamente il danno strutturale prodotto dai microrganismi sulle fibre tessili, distinguendo il semplice sviluppo superficiale del micelio dalle reali alterazioni della matrice cellulosa.

Alla luce di tali considerazioni, future ricerche dovrebbero prevedere prove sperimentali controllate nelle quali il medesimo inoculo fungino venga applicato a differenti materiali tessili mantenuti nelle stesse condizioni ambientali. Un simile approccio consentirebbe di valutare in maniera quantitativa il ruolo esercitato dalla composizione chimica del substrato nella selezione delle comunità fungine e nella suscettibilità al biodeterioramento, riducendo l'influenza delle variabili ambientali che caratterizzano inevitabilmente i campioni reali. Parallelamente, l'integrazione delle tradizionali tecniche colturali con metodiche molecolari ad alta risoluzione, metabarcoding e metagenomica permetterebbe di caratterizzare anche la componente non coltivabile delle comunità fungine, ottenendo una descrizione più completa della biodiversità microbica associata ai materiali tessili. Ulteriori sviluppi potrebbero inoltre riguardare l'applicazione di approcci multi-omici e l'integrazione tra dati tassonomici e funzionali.

Dal punto di vista forense, tali sviluppi potrebbero contribuire alla definizione di protocolli standardizzati per la caratterizzazione microbiologica dei campioni tessili e alla costruzione di banche dati relative alle comunità fungine associate ai diversi microambienti. L'integrazione tra isolamento colturale, identificazione molecolare, analisi metagenomiche e metodiche chimico-fisiche potrebbe infatti consentire di distinguere con maggiore accuratezza la semplice contaminazione ambientale dai reali fenomeni di biodeterioramento, migliorando l'interpretazione delle condizioni di esposizione, conservazione e permanenza dei campioni.

Sebbene tali applicazioni richiedano ancora un'ampia validazione sperimentale, esse rappresentano una prospettiva promettente per la micologia forense, nella quale le comunità fungine potrebbero costituire un'importante fonte di informazioni complementari per la ricostruzione della storia post-depositiva dei materiali tessili rinvenuti sulla scena del crimine.

5. CONCLUSIONI

Il presente studio ha consentito di caratterizzare la componente fungina coltivabile associata a quattro materiali differenti per natura e condizioni di esposizione: una camicia di cotone, una cintura di cuoio e due tessuti sintetici, rappresentati da un copridivano e da un ombrellone. L'integrazione tra isolamento colturale, osservazione macro- e micromorfologica e identificazione molecolare ha consentito di attribuire gli isolati a diversi taxa appartenenti ai generi *Alternaria*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Humicola*, *Mucor*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Stachybotrys* e *Trichoderma*. La caratterizzazione molecolare ha permesso, nella maggior parte dei casi, di affinare le attribuzioni preliminari ottenute su base morfologica fino al livello di specie. Nella camicia di cotone sono stati identificati *Humicola fuscoatra*, *Penicillium citrinum*, *Trichoderma koningiopsis*, *T. longibrachiatum*, *T. koningii*, *T. erinaceum* e *Fusarium oxysporum*; nella cintura di cuoio *Cladosporium halotolerans*, *C. eucommiae*, *Alternaria infectoria* e *Penicillium dipodomyicola*; nel copridivano sintetico *Trichoderma harzianum* e *Mucor circinelloides*; nell'ombrellone sintetico *Stachybotrys chlorohalonatus*, *Fusarium acuminatum*, *Pestalotiopsis maculiformans*, *Curvularia pseudolunata*, *Penicillium elantae* e *Alternaria brassicae*. Le attribuzioni caratterizzate da un supporto molecolare più limitato, come *H. fuscoatra*, *C. halotolerans* e *C. pseudolunata*, sono state considerate con maggiore cautela e interpretate congiuntamente alle caratteristiche morfologiche osservate. Il confronto tra i campioni ha evidenziato profili micologici differenti, suggerendo che la distribuzione degli isolati recuperati non dipenda esclusivamente dalla composizione del materiale, ma dall'interazione tra natura del substrato, condizioni microambientali e storia di esposizione del reperto. La camicia di cotone ha mostrato una netta prevalenza di *Trichoderma*, affiancato da *Penicillium*, *Humicola* e *Fusarium*, mentre nella cintura di cuoio sono stati recuperati rappresentanti di *Cladosporium*, *Alternaria* e *Penicillium*. Nei due materiali sintetici sono emerse differenze particolarmente evidenti: il copridivano, conservato in un ambiente caratterizzato da elevata umidità, ridotta ventilazione e scarsa illuminazione, ha restituito esclusivamente *T. harzianum* e *M. circinelloides*, mentre nell'ombrellone esposto in ambiente costiero è stata osservata una maggiore eterogeneità tassonomica, con il recupero di *S. chlorohalonatus*, *F. acuminatum*, *P. maculiformans*, *C. pseudolunata*, *P. elantae* e *A. brassicae*.

Questi risultati indicano quindi come fattori quali umidità, ventilazione, esposizione agli agenti atmosferici, deposizione di particolato e disponibilità di sostanza organica possano contribuire, insieme alle caratteristiche del substrato, alla selezione degli isolati fungini associati ai differenti materiali. La composizione osservata deve tuttavia essere interpretata come rappresentativa degli

isolati recuperabili mediante l'approccio colturale adottato e non come descrizione esaustiva dell'intera comunità fungina presente sui reperti.

La ricchezza tassonomica osservata e gli indici di Shannon e Simpson hanno fornito un'ulteriore descrizione della struttura degli isolati recuperati. L'ombrellone ha mostrato i valori più elevati, mentre il copridivano ha presentato i valori più bassi; camicia e cintura hanno mostrato valori intermedi. Tali indici sono stati utilizzati esclusivamente con finalità descrittiva ed esplorativa, poiché il diverso numero di isolati, la differente estensione dei campioni e la non uniformità dei punti e delle modalità di prelievo non consentono di interpretarli come una misura della biodiversità fungina reale né come un confronto statistico inferenziale tra i materiali.

Un aspetto importante emerso dal lavoro riguarda inoltre la distinzione tra colonizzazione, biodeterioramento e biodegradazione. Il recupero di isolati fungini vitali documenta la presenza di funghi associati ai campioni, ma non dimostra necessariamente una degradazione diretta della matrice strutturale. Tale cautela è particolarmente rilevante per i materiali sintetici, nei quali i microrganismi possono svilupparsi anche sfruttando residui organici, polvere, additivi o altre sostanze depositate sulla superficie. La dimostrazione di un'effettiva biodegradazione del materiale richiederebbe pertanto ulteriori analisi chimico-fisiche e strutturali. Nel contesto del presente studio risulta quindi più appropriato interpretare i risultati in termini di colonizzazione fungina associata a fenomeni di biodeterioramento.

Dal punto di vista forense, i risultati indicano che il valore informativo della componente fungina non risiede nella presenza isolata di un singolo taxon. Molti dei generi identificati sono infatti ampiamente distribuiti nell'ambiente e, considerati singolarmente, possiedono un limitato potere discriminante. Una maggiore utilità interpretativa può derivare invece dall'analisi congiunta della composizione degli isolati recuperati, della loro distribuzione sul reperto, della natura del substrato e delle condizioni di esposizione e conservazione. In questa prospettiva, la componente fungina può rappresentare una fonte di informazione biologica complementare utile alla ricostruzione della storia post-deposizionale di un materiale.

I dati ottenuti non consentono tuttavia di attribuire ai singoli taxa un'associazione diagnostica con uno specifico tessuto, né di utilizzare direttamente la colonizzazione fungina per determinare il tempo di permanenza o la provenienza di un reperto. Per sviluppare una maggiore applicabilità forense saranno necessari studi condotti su un numero più ampio di campioni, protocolli di campionamento standardizzati, condizioni sperimentali controllate e campioni ambientali di confronto. L'integrazione con tecniche di metabarcoding o metagenomica potrebbe inoltre ampliare la caratterizzazione della componente fungina, includendo anche taxa non recuperabili mediante coltura.

In conclusione, il lavoro evidenzia come la colonizzazione fungina dei materiali tessili derivi dall'interazione tra caratteristiche del substrato, microambiente e storia di esposizione. La micologia può quindi offrire un contributo potenzialmente utile nell'ambito forense, purché i risultati vengano interpretati con cautela e integrati con le altre evidenze disponibili. Più che come prova autonoma, il profilo fungino associato a un reperto può essere considerato un elemento complementare nella ricostruzione delle condizioni di conservazione, esposizione e trasformazione post-deposizionale del materiale.

6. BIBLIOGRAFIA

- Abdel-Maksoud, G., Abdel-Nasser, M., Sultan, M. H., Eid, A. M., Alotaibi, S. H., Hassan, S. E.-D., & Fouda, A. (2022). Fungal Biodeterioration of a Historical Manuscript Dating Back to the 14th Century: An Insight into Various Fungal Strains and Their Enzymatic Activities. *Life*, 12(11), 1821.
- Abdel-Rahman, T. M. A. (1992). Effect of the fungicide benomyl on cell wall degradation by some fungi. *Zentralblatt für Mikrobiologie*, 147(5), 329–339.
- Adams, R. I., Miletto, M., Taylor, J. W., & Bruns, T. D. (2013). Dispersal in microbes: Fungi in indoor air are dominated by outdoor air and show dispersal limitation at short distances. *The ISME Journal*, 7(7), 1262–1273.
- Ahmed, M., Iram, S., Tabassum, N., Sajid, M., Paseutsakoun, K., Aleksza, L., & Székács, A. (2025). Biodegradation Efficacy of *Aspergillus niger* and *Trichoderma harzianum* on Low-Density Polyethylene. *Polymers*, 17(10), 1303.
- Ali, M. M., Ibrahim, S. M., Abdelazim, M., & Zohri, A.-E. A. (2026). Statical optimization of cellulase enzymes production by *Trichoderma harzianum* PP400831 using response surface methodology and their application in production of 2G bioethanol. *Microbial Cell Factories*, 25(1), 55.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410.
- Analytical Methods Committee. (2014). PCR – the polymerase chain reaction. *Analytical Methods*, 6(2), 333–336.
- Andersen, B., Nielsen, K. F., Thrane, U., Szaro, T., Taylor, J. W., & Jarvis, B. B. (2003). Molecular and phenotypic descriptions of *Stachybotrys chlorohalonata* sp. nov. and two chemotypes of *Stachybotrys chartarum* found in water-damaged buildings. *Mycologia*, 95(6), 1227–1238.
- Angeles Flores, G., Venanzoni, R., Martino, S., & Angelini, P. (2026). Filamentous Fungi and the Biodeterioration of Organic Cultural Heritage Materials: A Systematic Review of Mechanisms, Risks, and Preventive Conservation Strategies. *Microorganisms*, 14(3), 526.
- Arutchelvi, J., Sudhakar, M., Arkatkar, A., Doble, M., Bhaduri, S., & Uppara, P. V. (2008). Biodegradation of polyethylene and polypropylene. *Indian Journal of Biotechnology*, 7(1), 9–22.
- Ba, Z., Zhang, M., Chen, Y., Cao, Y., Hu, Z., Kaya, M. G. A., & Tang, K. (2023). Fungal Deterioration on Ancient Leather Artifacts. *Journal of the American Leather Chemists Association*, 118(12), 529–537.
- Baba, Y., Shimonaka, A., Koga, J., Kubota, H., & Kono, T. (2005). Alternative Splicing Produces Two Endoglucanases with One or Two Carbohydrate-Binding Modules in *Mucor circinelloides*. *Journal of Bacteriology*, 187(9), 3045–3051.

- Bahram, M., Hildebrand, F., Forslund, S. K., Anderson, J. L., Soudzilovskaia, N. A., Bodegom, P. M., Bengtsson-Palme, J., Anslan, S., Coelho, L. P., Harend, H., Huerta-Cepas, J., Medema, M. H., Maltz, M. R., Mundra, S., Olsson, P. A., Pent, M., Pölme, S., Sunagawa, S., Ryberg, M., ... Bork, P. (2018). Structure and function of the global topsoil microbiome. *Nature*, 560(7717), 233–237.
- Baldeep, K., Surekha, B., & Urmila, P. (2015). Production of cellulases from *Humicola fuscoatra* MTCC 1409: Role of enzymes in paddy straw digestion. *African Journal of Microbiology Research*, 9(9), 631–638.
- Bensch, K., Braun, U., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2012). The genus *Cladosporium*. *Studies in Mycology*, 72, 1–401.
- Bensch, K., Groenewald, J. Z., Meijer, M., Dijksterhuis, J., Jurjević, Ž., Andersen, B., Houbraken, J., Crous, P. W., & Samson, R. A. (2018). *Cladosporium* species in indoor environments. *Studies in Mycology*, 89(1), 177–301.
- Bhatia, S., Kaur, B., Phutela, U. G., & Kumar, P. (2018). Kinetic and thermodynamic behavior of partially purified cellobiase from *Humicola fuscoatra* MTCC 1409. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 55(3), 163–172.
- Brunner, I., Fischer, M., Rüthi, J., Stierli, B., & Frey, B. (2018). Ability of fungi isolated from plastic debris floating in the shoreline of a lake to degrade plastics. *PLOS ONE*, 13(8), e0202047.
- Castrillo, M., Bich, G., Kramer, G., Velazquez, J., Rodriguez, M., Zapata, P., & Villalba, L. (2015). Evaluation of Synthetic and Semi- synthetic Culture Media for Endo-1,4-β- Glucanases Secretion by *Trichoderma koningiopsis*. *Procedia Materials Science*, 8, 786–792.
- Castrillo, M. L., Bich, G. Á., Modenutti, C., Turjanski, A., Zapata, P. D., & Villalba, L. L. (2017). First Whole-Genome Shotgun Sequence of a Promising Cellulase Secretor, *Trichoderma koningiopsis* Strain POS7. *Genome Announcements*, 5(37), e00823-17.
- Chao, A., & Jost, L. (2012). Coverage-based rarefaction and extrapolation: Standardizing samples by completeness rather than size. *Ecology*, 93(12), 2533–2547.
- Chen, Y., Su, P., Hyde, K., & Maharachchikumbura, S. (2023). Phylogenomics and diversification of Sordariomycetes. *Mycosphere*, 14(1), 414–451.
- Christakopoulos, P., Macris, B. J., & Kekos, D. (1989). Direct fermentation of cellulose to ethanol by *Fusarium oxysporum*. *Enzyme and Microbial Technology*, 11(4), 236–239.
- Davis, R. M., Colyer, P. D., Rothrock, C. S., & Kochman, J. K. (2006). Fusarium Wilt of Cotton: Population Diversity and Implications for Management. *Plant Disease*, 90(6), 692–703.
- De Assis, M. A., Da Silva, J. J. B., De Carvalho, L. M., Parreiras, L. S., Cairo, J. P. L. F., Marone, M. P., Gonçalves, T. A., Silva, D. S., Dantzger, M., De Figueiredo, F. L., Carazzolle, M. F., Pereira, G. A. G., & Damasio, A. (2024). A Multiomics Perspective on Plant Cell Wall-Degrading Enzyme Production: Insights from the Unexploited Fungus *Trichoderma erinaceum*. *Journal of Fungi*, 10(6), 407.

- Dettman, J. R., & Gerdis, S. (2024). *Alternaria* sections *Infectoriae* and *Pseudoalternaria*: New genomic resources, phylogenomic analyses, and biodiversity. *Mycologia*, 116(5), 659–672.
- Di Napoli, M., Silvestri, B., Castagliuolo, G., Carpentieri, A., Luciani, G., Di Maro, A., Sorbo, S., Pezzella, A., Zanfardino, A., & Varcamonti, M. (2023). High density polyethylene (HDPE) biodegradation by the fungus *Cladosporium halotolerans*. *FEMS Microbiology Ecology*, 99(2), fiac148.
- Do Vale, L. H. F., Gómez-Mendoza, D. P., Kim, M.-S., Pandey, A., Ricart, C. A. O., Filho, E. X. F., & Sousa, M. V. (2012). Secretome analysis of the fungus *Trichoderma harzianum* grown on cellulose. *Proteomics*, 12(17), 2716–2728.
- Dutta, S. D., Tarafder, M., Islam, R., & Datta, B. (2018). Characterization of cellulolytic enzymes of *Fusarium* soil Isolates. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 14, 279–285.
- Dutta, T., Sahoo, R., Sengupta, R., Ray, S. S., Bhattacharjee, A., & Ghosh, S. (2008). Novel cellulases from an extremophilic filamentous fungi *Penicillium citrinum*: Production and characterization. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 35(4), 275–282.
- Ekanayaka, A. H., Tibpromma, S., Dai, D., Xu, R., Suwannarach, N., Stephenson, S. L., Dao, C., & Karunarathna, S. C. (2022). A Review of the Fungi That Degrade Plastic. *Journal of Fungi*, 8(8), 772.
- Ekwomadu, T. I., & Mwanza, M. (2023). *Fusarium* Fungi Pathogens, Identification, Adverse Effects, Disease Management, and Global Food Security: A Review of the Latest Research. *Agriculture*, 13(9), 1810.
- Elamin, A., Takatori, K., Matsuda, Y., Tsukada, M., & Kirino, F. (2018). Fungal biodeterioration of artificial aged linen textile: Evaluation by microscopic, spectroscopic and viscometric methods. *Mediterranean Archaeology and Archaeometry*, 18(3), 103–120.
- Eleutério, T., Trota, M. J., Meirelles, M. G., & Vasconcelos, H. C. (2025). A Review of Natural Fibers: Classification, Composition, Extraction, Treatments, and Applications. *Fibers*, 13(9), 119.
- Gadd, G. M., Fomina, M., & Pinzari, F. (2024). Fungal biodeterioration and preservation of cultural heritage, artwork, and historical artifacts: Extremophily and adaptation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 88(1), e00200-22.
- Gadd, G. M., & McGregor, L. (2024). Fungal colonization and penetration of mortar as a suitable simulant for concrete: Implications for fungal biodeterioration in the built environment. *Fungal Biology*, 128(5), 1899–1906.
- Geethanjali, P. A., Gowtham, H. G., & Jayashankar, M. (2020). Biodegradation potential of indigenous litter dwelling ligninolytic fungi on agricultural wastes. *Bulletin of the National Research Centre*, 44(1), 173.
- Gubała, D., Harniman, R., Eloi, J.-C., Wąsik, P., Wermeille, D., Sun, L., Robles, E., Chen, M., & Briscoe, W. H. (2020). Multiscale characterisation of single synthetic fibres: Surface morphology and nanomechanical properties. *Journal of Colloid and Interface Science*, 571, 398–411.

- Gutarowska, B. (2014). Moulds in biodeterioration of technical materials. *Folia Biologica et Oecologica*, 10, 27–39.
- Hammad, A., Beaugrand, K., Ross, J. A., Allan, N., & Berman, M. (2025). Assessing mold growth severity on various textiles: Comparative analysis of inoculum densities and fungal strains. *Sustainable Microbiology*, 2(1), qvae035.
- Harper, R., & Moody, S. C. (2023). Filamentous Fungi Are Potential Bioremediation Agents of Semi-Synthetic Textile Waste. *Journal of Fungi*, 9(6), 661.
- Hasanin, M. S., Mostafa, A. M., Mwafy, E. A., & Darwesh, O. M. (2018). Eco-friendly cellulose nano fibers via first reported Egyptian *Humicola fuscoatra* Egyptia X4: Isolation and characterization. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 10, 409–418.
- Hawksworth, D. L., & Wiltshire, P. (2015). Forensic mycology: Current perspectives. *Research and Reports in Forensic Medical Science*, 5, 75–83.
- Hawksworth, D. L., & Wiltshire, P. E. J. (2011). Forensic mycology: The use of fungi in criminal investigations. *Forensic Science International*, 206(1–3), 1–11.
- Heseltine, E., & Rosen, J. (Eds.). (2009). *WHO guidelines for indoor air quality: Dampness and mould*. WHO Regional Office for Europe.
- Huang, Y., Busk, P. K., Grell, M. N., Zhao, H., & Lange, L. (2014). Identification of a β -glucosidase from the *Mucor circinelloides* genome by peptide pattern recognition. *Enzyme and Microbial Technology*, 67, 47–52.
- Ibrahim, S. R. M., Choudhry, H., Asseri, A. H., Elfaky, M. A., Mohamed, S. G. A., & Mohamed, G. A. (2022). *Stachybotrys chartarum*—A Hidden Treasure: Secondary Metabolites, Bioactivities, and Biotechnological Relevance. *Journal of Fungi*, 8(5), 504.
- Karadayı, S. (2021). Assessment of the link between evidence and crime scene through soil bacterial and fungal microbiome: A mock case in forensic study. *Forensic Science International*, 329, 111060.
- Karanth, D. V., & Isukapatla, A. R. (2026). Fact-finding with fungi: A scoping review on recent advancements in the role of fungi as evidence in forensic science. *International Journal of Legal Medicine*, 140(1), 505–517.
- Kavkler, K., Gunde Cimerman, N., Zalar, P., & Demšar, A. (2015). Deterioration of contemporary and artificially aged cotton by selected fungal species. *Polymer Degradation and Stability*, 113, 1–9.
- Kavkler, K., Gunde-Cimerman, N., Zalar, P., & Demšar, A. (2011). FTIR spectroscopy of biodegraded historical textiles. *Polymer Degradation and Stability*, 96(4), 574–580.
- Khan, N. A., Asaf, S., Ahmad, W., Jan, R., Bilal, S., Khan, I., Khan, A. L., Kim, K.-M., & Al-Harrasi, A. (2023). Diversity, Lifestyle, Genomics, and Their Functional Role of *Cochliobolus*, *Bipolaris*, and *Curvularia* Species in Environmental Remediation and Plant Growth Promotion under Biotic and Abiotic Stressors. *Journal of Fungi*, 9(2), 254.

- Kuhad, R. C., Gupta, R., & Singh, A. (2011). Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. *Enzyme Research*, 2011, 1–10.
- Kwon, H. W., Yoon, J. H., Kim, S. H., Hong, S. B., Cheon, Y., & Ko, S. J. (2007). Detection of extracellular enzyme activities in various *Fusarium* spp. *Mycobiology*, 35(3), 162–165.
- Lawrence, D. P., Gannibal, P. B., Peever, T. L., & Pryor, B. M. (2013). The sections of *Alternaria*: Formalizing species-group concepts. *Mycologia*, 105(3), 530–546.
- Li, K., Bihan, M., Yooseph, S., & Methé, B. A. (2012). Analyses of the Microbial Diversity across the Human Microbiome. *PLoS ONE*, 7(6), e32118.
- Lombard, L., Houbraken, J., Decock, C., Samson, R. A., Meijer, M., Réblová, M., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2016). Generic hyper-diversity in Stachybotriaceae. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 36(1), 156–246.
- Lozupone, C. A., & Knight, R. (2008). Species divergence and the measurement of microbial diversity. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(4), 557–578.
- Maestri, C., Plancher, L., Duthoit, A., Hébert, R. L., & Di Martino, P. (2023). Fungal Biodegradation of Polyurethanes. *Journal of Fungi*, 9(7), 760.
- Marin-Felix, Y., Hernández-Restrepo, M., & Crous, P. W. (2020). Multi-locus phylogeny of the genus *Curvularia* and description of ten new species. *Mycological Progress*, 19(6), 559–588.
- Miettinen-Oinonen, A., & Suominen, P. (2002). Enhanced Production of *Trichoderma reesei* Endoglucanases and Use of the New Cellulase Preparations in Producing the Stonewashed Effect on Denim Fabric. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8), 3956–3964.
- Montegut, D., Indictor, N., & Koestler, R. J. (1991). Fungal deterioration of cellulosic textiles: A review. *International Biodeterioration*, 28(1–4), 209–226.
- Morin-Sardin, S., Nodet, P., Coton, E., & Jany, J.-L. (2017). *Mucor*: A Janus-faced fungal genus with human health impact and industrial applications. *Fungal Biology Reviews*, 31(1), 12–32.
- Morris, E. K., Caruso, T., Buscot, F., Fischer, M., Hancock, C., Maier, T. S., Meiners, T., Müller, C., Obermaier, E., Prati, D., Socher, S. A., Sonnemann, I., Wäschke, N., Wubet, T., Wurst, S., & Rillig, M. C. (2014). Choosing and using diversity indices: Insights for ecological applications from the German Biodiversity Exploratories. *Ecology and Evolution*, 4(18), 3514–3524.
- Mullis, K. B., & Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155, 335–350.
- Orlita, A. (2004). Microbial biodeterioration of leather and its control: A review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 53(3), 157–163.
- Peay, K. G., Kennedy, P. G., & Talbot, J. M. (2016). Dimensions of biodiversity in the Earth mycobiome. *Nature Reviews Microbiology*, 14(7), 434–447.

- Piazza, S. D., Giusto, S., Cecchi, G., Zinni, M., & Zotti, M. (2026). Beyond colonies counts: Molecular identification and biodeteriorative traits of airborne *Cladosporium* in a historical book archive [Preprint]. SSRN.
- Raja, H. A., Miller, A. N., Pearce, C. J., & Oberlies, N. H. (2017). Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *Journal of Natural Products*, 80(3), 756–770.
- Rajarammohan, S., Paritosh, K., Pental, D., & Kaur, J. (2019). Comparative genomics of *Alternaria* species provides insights into the pathogenic lifestyle of *Alternaria brassicae* – a pathogen of the Brassicaceae family. *BMC Genomics*, 20(1), 1036.
- Rodrigues, A., Gutierrez-Patricio, S., Miller, A. Z., Saiz-Jimenez, C., Wiley, R., Nunes, D., Vilarigues, M., & Macedo, M. F. (2014). Fungal biodeterioration of stained-glass windows. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 90, 152–160.
- Russell, J. R., Huang, J., Anand, P., Kucera, K., Sandoval, A. G., Dantzler, K. W., Hickman, D., Jee, J., Kimovec, F. M., Koppstein, D., Marks, D. H., Mittermiller, P. A., Núñez, S. J., Santiago, M., Townes, M. A., Vishnevetsky, M., Williams, N. E., Vargas, M. P. N., Boulanger, L.-A., ... Strobel, S. A. (2011). Biodegradation of Polyester Polyurethane by Endophytic Fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(17), 6076–6084.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., & Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839), 487–491.
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W., & Fungal Barcoding Consortium. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), 6241–6246.
- Schüle, M. (1997). Enzymatic properties of cellulases from *Humicola insolens*. *Journal of Biotechnology*, 57(1–3), 71–81.
- Schuster, A., & Schmoll, M. (2010). Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(3), 787–799.
- Silva, B. M. A., Prados-Rosales, R., Espadas-Moreno, J., Wolf, J. M., Luque-Garcia, J. L., Goncalves, T., & Casadevall, A. (2014). Characterization of *Alternaria infectoria* extracellular vesicles. *Medical Mycology*, 52(2), 202–210.
- Srikanth, M., Sandeep, T. S. R. S., Sucharitha, K., & Godi, S. (2022). Biodegradation of plastic polymers by fungi: A brief review. *Bioresources and Bioprocessing*, 9(1), 42.
- Sterflinger, K., & Pinzari, F. (2012). The revenge of time: Fungal deterioration of cultural heritage with particular reference to books, paper and parchment. *Environmental Microbiology*, 14(3), 559–566.
- Szostak-Kotowa, J. (2004). Biodeterioration of textiles. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 53(3), 165–170.

- Tselepi, V., Sarkiris, P., Nioras, D., Tsouko, E., Sarris, D., Gogolides, E., & Ellinas, K. (2024). Functional Surfaces for Passive Fungal Proliferation Control: Effect of Surface Micro- and Nanotopography, Material, and Wetting Properties. *ACS Applied Bio Materials*, 7(7), 4510–4518.
- Walther, G., Wagner, L., & Kurzai, O. (2020). Outbreaks of Mucorales and the species involved. *Mycopathologia*, 185(5), 765–781.
- Wang, S.-Y., Wang, Y., & Li, Y. (2022). *Cladosporium* spp. (Cladosporiaceae) isolated from *Eucommia ulmoides* in China. *MycKeys*, 91, 151–168.
- Warnasuriya, S. D., Udayanga, D., Manamgoda, D. S., & Biles, C. (2023). Fungi as environmental bioindicators. *Science of The Total Environment*, 892, 164583.
- Wei, Y., Cao, X., Su, Z., Xu, K., Guo, J., Zhang, Z., Yuan, H., & Li, S. (2026). Developing efficient cleaning agents for textile relics affected by mold stains. *Npj Heritage Science*, 14(1), 226.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, & T. J. White (Eds.), *PCR protocols: A guide to methods and applications* (pp. 315–322). Academic Press.
- Wood, T. M., & McCrae, S. I. (1978). The cellulase of *Trichoderma koningii*. Purification and properties of some endoglucanase components with special reference to their action on cellulose when acting alone and in synergism with the cellobiohydrolase. *Biochemical Journal*, 171(1), 61–72.
- Woudenberg, J. H. C., Groenewald, J. Z., Binder, M., & Crous, P. W. (2013). *Alternaria* redefined. *Studies in Mycology*, 75, 171–212.
- Xu, X., Fan, C., Song, L., Li, J., Chen, Y., Zhang, Y., Liu, B., & Zhang, W. (2019). A Novel CreA-Mediated Regulation Mechanism of Cellulase Expression in the Thermophilic Fungus *Humicola insolens*. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(15), 3693.
- Yehia, R. S. (2023). Highlighting the potential for crude oil bioremediation of locally isolated *Cunninghamella echinulata* and *Mucor circinelloides*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 54(3), 1969–1981.
- Zalar, P., De Hoog, G. S., Schroers, H.-J., Crous, P. W., Groenewald, J. Z., & Gunde-Cimerman, N. (2007). Phylogeny and ecology of the ubiquitous saprobe *Cladosporium sphaerospermum*, with descriptions of seven new species from hypersaline environments. *Studies in Mycology*, 58, 157–183.
- Zhang, J., Han, Z., Teng, B., & Chen, W. (2017). Biodeterioration process of chromium tanned leather with *Penicillium* sp. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 116, 104–111.
- Zhang, K., Hu, J., Yang, S., Xu, W., Wang, Z., Zhuang, P., Grossart, H.-P., & Luo, Z. (2022). Biodegradation of polyester polyurethane by the marine fungus *Cladosporium halotolerans* 6UPA1. *Journal of Hazardous Materials*, 437, 129406.