

CINTEST – UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA REPORT DI FINE ATTIVITÀ

"CARATTERIZZAZIONE DEL BIO-AEROSOL DELLA GROTTA TERMALE DELLE TERME DEI PAPI E STIMA DEL RISCHIO DI TRASMISSIONE DELL'INFEZIONE PER VIA AEREA DEL VIRUS SARS-COV-2 NEL MICROAMBIENTE GROTTA TERMALE".





RESPONSABILE SCIENTIFICO

PROF. GIUSEPPE CALABRÒ

July laloh

AUTORI

DOTT.SSA SILVIA CROGNALE ING. MAURO SCUNGIO DOTT.SSA ELEONORA CAROTA

INDICE

1. Caratterizzazione dell'aerosol all'interno della grotta termale e della relativa carica microbica da esso veicolata
1.1. Analisi delle caratteristiche fisiche dell'aerosol3
1.1.1. Metodologia di misura
1.1.2. Caratteristiche e principio di funzionamento dello spettrometro OPS3
1.1.3. Risultati delle misure
1.1.3.1. Caratteristiche fisiche dell'aerosol misurato in background
1.1.3.2. Caratteristiche fisiche dell'aerosol misurato nella sala d'attesa
1.1.3.3. Caratteristiche fisiche dell'aerosol misurato nell'antigrotta9
1.1.3.4. Caratteristiche fisiche dell'aerosol misurato nella grotta11
1.1.3.5. Deposizione dell'aerosol in grotta nell'apparato respiratorio13
1.2. Caratterizzazione della carica microbica veicolata dall'aerosol nella grotta termale16
1.2.1. Metodologia di misura16
1.2.2. Risultati
1.2.2.1. Scelta del terreno colturale più idoneo al campionamento dei microrganismi della grotta17
1.2.2.2. Determinazione della carica microbica delle acque termali e del bioaerosol della grotta mediante campionamento passivo
1.2.2.3. Determinazione della carica microbica del bioaerosol mediante campionamento attivo19
1.2.2.4. Biodiversità microbica della comunità coltivabile aerodispersa presente in grotta e possibili potenzialità applicative
2. Valutazione del rischio di contagio da SARS-CoV-2 nella grotta termale23
2.1. Descrizione dell'approccio modellistico
2.2. Parametri del modello e scenari ipotizzati
2.3. Risultati delle simulazioni
Conclusioni e prospettive future
Bibliografia

1. Caratterizzazione dell'aerosol all'interno della grotta termale e della relativa carica microbica da esso veicolata

1.1. Analisi delle caratteristiche fisiche dell'aerosol

Le grotte termali rappresentano un ambiente caratterizzato da proprietà chimico-fisiche uniche. Tuttavia, poiché sono degli ambienti chiusi e fruibili da molte persone, recentemente, a causa della pandemia legata alla diffusione del COVID 19, questi ambienti sono stati sottoposti a procedure restrittive che non ne consentono l'utilizzo.

In questa sezione sono riportati i dati risultanti da una campagna sperimentale di misura delle caratteristiche fisiche dell'aerosol nella grotta termale e nelle aree immediatamente adiacenti con lo scopo di misurare l'esposizione personale alle concentrazioni di aerosol presenti sia in grotta che in piscina e stimare la frazione di aerosol depositata nella zona tracheo-bronchiale e alveolare dell'apparato respiratorio. Le proprietà analizzate sono relative alle concentrazioni di aerosol in termini di numero, area superficiale e massa delle particelle per unità di volume di aria. Queste tre "metriche" sono considerate le principali da analizzare in quanto la loro conoscenza consente di caratterizzare al meglio l'effetto dell'aerosol atmosferico sulla salute umana.

1.1.1. Metodologia di misura

La campagna sperimentale di misura è stata effettuata in un periodo di due giorni (24 e 25 giugno 2020) all'interno della grotta termale e in altre aree immediatamente adiacenti. Le misure sono state effettuate mediante uno spettrometro OPS (Optical Particle Sizer) modello 3330 prodotto dalla TSI (Minnesota, USA) le cui caratteristiche e il principio di funzionamento sono riportati di seguito.

I campionamenti sono stati eseguiti nei giorni indicati al mattino, prima del primo ingresso in grotta e alla sera, dopo l'ultimo ingresso, direttamente all'interno della grotta stessa, in modo da osservare eventuali variazioni giornaliere delle caratteristiche dell'aerosol. Sono state eseguite in totale 4 misure (una al mattino e una alla sera per ciascun giorno), ogni misura rappresenta la media di diversi campionamenti della durata di 100 secondi. Ciascuna misura è relativa ad una concentrazione in numero, area superficiale e massa di particelle per unità di volume di aria campionata. Al fine di confrontare la misura in grotta con le aree immediatamente adiacenti, sono stati effettuati ulteriori campionamenti, con la stessa metodologia, in antigrotta (zona di acclimatamento precedente la grotta vera e propria separata da questa da una porta), in sala d'attesa (zona immediatamente esterna all'antigrotta separata da questa da una porta) e all'esterno (area sovrastante la grotta nei pressi del lucernario) al fine di avere un valore di background.

1.1.2. Caratteristiche e principio di funzionamento dello spettrometro OPS

Lo spettrometro OPS TSI 3330 funziona secondo il principio dello scattering ottico delle singole particelle (Figura 1). Le particelle sono illuminate usando un raggio laser che illumina la zona a valle dell'ugello di ingresso del flusso di aerosol. Quando le particelle passano attraverso il laser, diffrangono la luce sotto forma di impulsi e vengono quindi contate e dimensionate simultaneamente. La concentrazione misurata dall'OPS è funzione della portata e quindi il flusso è strettamente mantenuto a 1.0 L/min ± 5%. Lo spettrometro prevede anche un flusso di aria di supporto separato di 1.0 L/min la cui funzione è quella di mantenere le particelle strettamente confinate nella zona di rilevamento. Il flusso di supporto è completamente interno allo strumento: esso deriva dallo scarico della pompa che attraversa un filtro HEPA e viene quindi ricircolato nuovamente nella camera di misura. Due trasduttori di pressione

monitorano il flusso di aerosol e il flusso di supporto e regolano la portata della pompa per mantenere i flussi entro le loro specifiche.

Gli impulsi prodotti dal passaggio delle particelle attraverso il laser vengono suddivisi in 16 canali diversi. L'intensità dell'impulso è proporzionale alla dimensione delle particelle. Attraverso una calibrazione effettuata utilizzando particelle di lattice di polistirene sferico monodisperse (PSL), le diverse intensità degli impulsi sono correlate a diverse dimensioni delle particelle.



Figura 1. Schema e principio di funzionamento dello spettrometro OPS TSI 3330.

Di seguito sono riportate le principali caratteristiche dello spettrometro:

- Principio di funzionamento: scattering ottico;
- Concentrazione massima di 3000 particelle/cm³ e tra 0.001 e 275000 μg/m³;
- Intervallo dimensionale compreso tra 0.3 e 10 μm in 16 canali;
- Frequenza di campionamento ≥ 1 secondo;
- Portata volumetrica: 1 L/min per l'aerosol campione e 1 L/min per il flusso di supporto.

1.1.3. Risultati delle misure

In questa sezione vengono riportati i risultati delle misure nelle diverse aree oggetto di campionamento. I dati sono mostrati in termini di distribuzioni dimensionali e concentrazioni totali in numero, area superficiale e massa. Dal momento che dalle misure effettuate non sono state osservate variazioni significative delle caratteristiche dell'aerosol tra i due giorni oggetto delle misure e tra le misure

effettuate mattina e sera, per ogni area vengono riportate le caratteristiche medie con la relativa deviazione standard. I dati sono così organizzati:

- Caratteristiche fisiche dell'aerosol misurato in background (paragrafo 1.1.3.1);
- Caratteristiche fisiche dell'aerosol misurato nella sala d'attesa (paragrafo 1.1.3.2);
- Caratteristiche fisiche dell'aerosol misurato nell'antigrotta (paragrafo 1.1.3.3);
- Caratteristiche fisiche dell'aerosol misurato nella grotta (paragrafo 1.1.3.4);
- Deposizione dell'aerosol in grotta nell'apparato respiratorio (paragrafo 1.1.3.5).

1.1.3.1. Caratteristiche fisiche dell'aerosol misurato in background



Figura 2. Distribuzione dimensionale dell'aerosol misurato in <u>background</u> (area esterna sovrastante la grotta) in termini di <u>numero</u> di particelle per cm³ di aria campionata, nell'intervallo dimensionale compreso tra 0.374 μm e 10 μm in diametro. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard nei dati di concentrazione misurata su ciascun canale.



Figura 3. Distribuzione dimensionale dell'aerosol misurato in <u>background</u> (area esterna sovrastante la grotta) in termini di <u>area superficiale</u> delle particelle per cm³ di aria campionata, nell'intervallo dimensionale compreso tra

0.374 μm e 10 μm in diametro. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard nei dati di concentrazione misurata su ciascun canale.



Figura 4. Distribuzione dimensionale dell'aerosol misurato in <u>background</u> (area esterna sovrastante la grotta) in termini di <u>massa</u> delle particelle per m³ di aria campionata, nell'intervallo dimensionale compreso tra 0.374 μm e 10 μm in diametro. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard nei dati di concentrazione misurata su ciascun canale.

Tabella 1. Concentrazioni medie dell'aerosol misurato in <u>background</u> (area esterna sovrastante la grotta) in termini
di numero di particelle per cm³ di aria (N), area superficiale delle particelle per cm³ di aria (SA) e massa delle
particelle per m³ di aria (M).

	Concentrazione totale media	Deviazione standard
N (#/cm³)	17.62	0.08
SA (μm²/cm³)	19.81	0.21
M (μg/m³)	11.59	0.07



1.1.3.2. Caratteristiche fisiche dell'aerosol misurato nella sala d'attesa

Figura 5. Distribuzione dimensionale dell'aerosol misurato in <u>sala d'attesa</u> (area adiacente l'ingresso della grotta) in termini di <u>numero</u> di particelle per cm³ di aria campionata, nell'intervallo dimensionale compreso tra 0.374 μm e 10 μm in diametro. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard nei dati di concentrazione misurata su ciascun canale.



Figura 6. Distribuzione dimensionale dell'aerosol misurato in <u>sala d'attesa</u> (area adiacente l'ingresso della grotta) in termini di <u>area superficiale</u> delle particelle per cm³ di aria campionata, nell'intervallo dimensionale compreso tra 0.374 μm e 10 μm in diametro. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard nei dati di concentrazione misurata su ciascun canale.



Figura 7. Distribuzione dimensionale dell'aerosol misurato in <u>sala d'attesa</u> (area adiacente l'ingresso della grotta) in termini di <u>massa</u> delle particelle per m³ di aria campionata, nell'intervallo dimensionale compreso tra 0.374 μm e 10 μm in diametro. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard nei dati di concentrazione misurata su ciascun canale.

Tabella 2. Concentrazioni medie dell'aerosol misurato in <u>sala d'attesa</u> (area adiacente l'ingresso della grotta) in termini di numero di particelle per cm³ di aria (N), area superficiale delle particelle per cm³ di aria (SA) e massa delle particelle per m³ di aria (M).

	Concentrazione totale media	Deviazione standard		
N (#/cm³)	35.7	2.2		
SA (μm²/cm³)	58	12		
Μ (μg/m³)	37	11		





Figura 8. Distribuzione dimensionale dell'aerosol misurato in <u>antigrotta</u> (zona di acclimatamento precedente la grotta) in termini di <u>numero</u> di particelle per cm³ di aria campionata, nell'intervallo dimensionale compreso tra 0.374 μm e 10 μm in diametro. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard nei dati di concentrazione misurata su ciascun canale.



Figura 9. Distribuzione dimensionale dell'aerosol misurato in <u>antigrotta</u> (zona di acclimatamento precedente la grotta) in termini di <u>area superficiale</u> delle particelle per cm³ di aria campionata, nell'intervallo dimensionale compreso tra 0.374 μm e 10 μm in diametro. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard nei dati di concentrazione misurata su ciascun canale.



Figura 10. Distribuzione dimensionale dell'aerosol misurato in <u>antigrotta</u> (zona di acclimatamento precedente la grotta) in termini di <u>massa</u> delle particelle per m³ di aria campionata, nell'intervallo dimensionale compreso tra 0.374 μm e 10 μm in diametro. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard nei dati di concentrazione misurata su ciascun canale.

Tabella 3. Concentrazioni medie dell'aerosol misurato in <u>antigrotta</u> (zona di acclimatamento precedente la grotta) in termini di numero di particelle per cm³ di aria (N), area superficiale delle particelle per cm³ di aria (SA) e massa delle particelle per m³ di aria (M).

	Concentrazione totale media	Deviazione standard		
N (#/cm³)	68.4	7.4		
SA (μm²/cm³)	95.9	0.9		
Μ (μg/m³)	48.7	1.7		



1.1.3.4. Caratteristiche fisiche dell'aerosol misurato nella grotta

Figura 11. Distribuzione dimensionale dell'aerosol misurato all'interno della <u>grotta</u> in termini di <u>numero</u> di particelle per cm³ di aria campionata, nell'intervallo dimensionale compreso tra 0.374 μm e 10 μm in diametro. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard nei dati di concentrazione misurata su ciascun canale.



Figura 12. Distribuzione dimensionale dell'aerosol misurato all'interno della <u>grotta</u> in termini di <u>area superficiale</u> delle particelle per cm³ di aria campionata, nell'intervallo dimensionale compreso tra 0.374 μm e 10 μm in diametro. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard nei dati di concentrazione misurata su ciascun canale.



Figura 13. Distribuzione dimensionale dell'aerosol misurato all'interno della <u>grotta</u> in termini di <u>massa</u> delle particelle per m³ di aria campionata, nell'intervallo dimensionale compreso tra 0.374 μm e 10 μm in diametro. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard nei dati di concentrazione misurata su ciascun canale.

Tabella 4. Concentrazioni medie dell'aerosol misurato all'interno della <u>grotta</u> in termini di numero di particelle per cm³ di aria (N), area superficiale delle particelle per cm³ di aria (SA) e massa delle particelle per m³ di aria (M).

	Concentrazione totale media	Deviazione standard
N (#/cm³)	6.9×10 ²	1.3×10 ²
SA (μm²/cm³)	9.5×10 ⁴	2.2×10 ⁴
Μ (μg/m³)	1.2×10 ⁵	2.7×10 ⁴

Tabella 5. Confronto delle concentrazioni medie in numero, area superficiale e massa misurate nei diversi ambienti.

Concentrazione totale media	Background	Sala attesa	Antigrotta	Grotta
N (#/cm³)	17.62	35.7	68.4	6.9×10 ²
SA (μm²/cm³)	19.81	58	95.9	9.5×10 ⁴
Μ (μg/m³)	11.59	37	48.7	1.2×10 ⁵

Dall'analisi dei dati riportati si nota come le distribuzioni dimensionali dell'aerosol campionato tendono ad avere le medesime caratteristiche per tutte le aree analizzate ad eccetto della grotta, con le distribuzioni in numero la cui moda (valore di concentrazione con la più alta frequenza di accadimento, corrispondente al diametro relativo al massimo delle curve) è localizzata sulle taglie dimensionali più piccole (0.3 μ m) e quelle in massa sulle taglie più grandi (6 - 10 μ m), mentre delle distribuzioni tendenzialmente tri-modali risultano per l'area superficiale (0.3, 2-3 e 6-8 μ m). Come atteso, differenze significative si osservano invece per i dati misurati in grotta, con una distribuzione bimodale per la

concentrazione in numero (0.3 e 8 μ m) e unimodale per area superficiale e massa (10 μ m). In particolare, la distribuzione dimensionale in numero evidenzia la presenza in grotta di una frazione significativa di particelle le cui dimensioni sono sotto la soglia di rilevabilità dello spettrometro (particelle submicrometriche) pur essendo comunque netta la preponderanza della frazione con moda intorno agli 8 μ m (aspetto confermato dalla distribuzione dimensionale in area superficiale con moda a 10 μ m). Discorso a parte invece va fatto per le distribuzioni in area superficiale e massa che evidenziano entrambe una moda totalmente spostata sulle taglie dimensionali più grandi, ad indicare la presenza in grotta prevalentemente di particelle super-micrometriche costituite, presumibilmente, da goccioline di acqua in sospensione in aria.

Per quanto riguarda le concentrazioni totali medie, va osservato che mentre i valori relativi al background, alla sala d'attesa e all'antigrotta sono confrontabili, differenze molto significative esistono, come atteso, per i valori misurati all'interno della grotta che risultano di quattro ordini di grandezza più alti (11.6 μ g/m³ misurati in background contro gli 1.2×10⁵ μ g/m³ misurati in grotta).



1.1.3.5. Deposizione dell'aerosol in grotta nell'apparato respiratorio

A partire dalle distribuzioni dimensionali dell'aerosol misurato in grotta e utilizzando delle apposite curve di deposizione è possibile stimare la frazione di particelle che depositano all'interno dell'apparato respiratorio.

Figura 14. Curve di deposizione di particelle nell'apparato respiratorio (regione alveolare e tracheobronchiale) per adulti a riposo (seduti) che respirano prevalentemente dal naso [1]: maschio (rateo di inalazione di 0.54 m³/h) regione alveolare (in alto a sinistra) e tracheobronchiale (in alto a destra); femmina (rateo di inalazione di 0.39 m³/h) regione alveolare (in basso a sinistra) e tracheobronchiale (in basso a destra).

In Figura 14 sono riportate le curve di deposizione nella regione tracheo-bronchiale ed alveolare specifiche per donne e uomini adulti a riposo (seduti) che respirano prevalentemente dal naso [1], situazione tipica delle persone che occupano la grotta termale. Tali curve riportano la frazione di particelle

che depositano in funzione del loro diametro e sono state utilizzate per calcolare le distribuzioni dimensionali e le concentrazioni totali medie di aerosol depositato nell'apparato respiratorio in termini di numero, area superficiale e massa, come riportato nelle figure seguenti e in Tabella 6.



Figura 15. Distribuzione dimensionale media (maschio – femmina, regione alveolare e tracheobronchiale) di particelle <u>in grotta</u> depositate nell'apparato respiratorio in termini di <u>numero</u> per cm³ di aria nell'intervallo dimensionale compreso tra 0.374 μm e 10 μm in diametro.



Figura 16. Distribuzione dimensionale media (maschio – femmina, regione alveolare e tracheobronchiale) di particelle <u>in grotta</u> depositate nell'apparato respiratorio in termini di <u>area superficiale</u> per cm³ di aria nell'intervallo dimensionale compreso tra 0.374 μm e 10 μm in diametro.



Figura 17. Distribuzione dimensionale media (maschio – femmina, regione alveolare e tracheobronchiale) di particelle <u>in arotta</u> depositate nell'apparato respiratorio in termini di <u>massa</u> per m³ di aria nell'intervallo dimensionale compreso tra 0.374 μm e 10 μm in diametro.

Le distribuzioni dimensionali di particelle depositate (numero, area superficiale e massa) ricalcano, come atteso, i dati misurati anche se, osservando le curve di deposizione, è possibile affermare che una maggiore frazione di particelle più piccole depositano più facilmente all'interno dell'apparato respiratorio. Considerando, tuttavia, che l'aerosol misurato in grotta è composto prevalentemente da particelle supermicrometriche, si può concludere che è questa la maggioranza di particelle che si depositano nell'apparato respiratorio. Tale aspetto rende particolarmente affidabile l'utilizzo del modello di valutazione del rischio di infezione nella grotta, riportato nel capitolo seguente.

	Mas	chio	Femmina		
	ALV TB		ALV	ТВ	
N (#/cm³)	68.02	25.84	59.46	28.37	
SA (μm²/cm³)	6.37×10 ³	3.12×10 ³	5.90×10 ³	3.37×10 ³	
Μ (μg/m³)	7.85×10 ³	4.00×10 ³	7.30×10 ³	4.29×10 ³	

Tabella 6. Concentrazione totale in numero, area superficiale e massa dell'aerosol <u>in grotta</u> depositato nei diversi tratti dell'apparato respiratorio per unità di volume di aria inalata (adulti a riposo, maschio – femmina, ALV = regione alveolare, TB = regione tracheobronchiale).

1.2. Caratterizzazione della carica microbica veicolata dall'aerosol nella grotta termale

Introduzione

In questa fase di attenzione massima verso i rischi biologici correlati alla diffusione del nuovo coronavirus, un interesse speciale è stato indirizzato verso la sorveglianza microbiologica dell'aria. La caratterizzazione delle componenti del bioaerosol è oggetto di crescente interesse nella comunità scientifica, soprattutto per gli effetti che tali componenti hanno sulla salute umana: infezioni, asma, allergie e altre malattie delle vie respiratorie.

I rischi sono influenzati non solo dalla capacità di penetrazione dell'aerosol nel sistema respiratorio, ma anche dalla sua composizione e dalla sua attività biologica. Attraverso il campionamento dell'aria, è possibile valutare la contaminazione microbica in ambienti ad alto rischio di infezione, permettendo inoltre di controllare l'efficienza di eventuali sistemi di ventilazione controllata e delle procedure igieniche adottate da parte del personale addetto alle pulizie.

L'ambiente della grotta termale oggetto del presente studio è caratterizzato da umidità del 100%, pertanto le alte concentrazioni di aerosol possono rappresentare da un lato un possibile veicolo di trasmissione degli agenti biologici patogeni immessi negli ambienti da individui infettivi, ma anche di specifici microrganismi ambientali che possono avere tratti benefici ed essere responsabili del buon funzionamento del microbioma umano nel tratto respiratorio.

Lo scopo di questa attività è stato quello di determinare la carica microbica presente nell'aerosol della grotta termale.

1.2.1. Metodologia di misura

La campagna sperimentale di misura è stata effettuata in diverse giornate (24/06/2020, 25/06/2020, 1/07/2020 e 03/08/2020), durante le quali sono state utilizzate procedure di campionamento dell'aria sia di tipo passivo che attivo.

Nel campionamento passivo si espongono nell'ambiente in esame, per opportuni intervalli di tempo, piastre di Petri contenenti idoneo terreno di coltura: su di esse si raccolgono per sedimentazione i microrganismi veicolati da particelle solide o liquide sospese nell'aria. Dopo opportuna incubazione delle piastre, si procede alla conta del numero di colonie cresciute. L'efficienza di raccolta dipende dalle caratteristiche aerodinamiche delle particelle e dal grado di ventilazione dell'ambiente.

Il campionamento attivo prevede l'utilizzo di campionatori di aria che aspirano volumi predeterminati di aria, convogliandoli su un terreno di coltura liquido o solido. I microrganismi presenti nell'aria aderiscono al terreno e, dopo un adeguato periodo di incubazione, danno origine a colonie visibili a occhio nudo, che si possono numerare e, dopo isolamento, identificare. Il livello di contaminazione microbica si esprime come Unità Formanti Colonie (CFU) per m³ di aria. Questo metodo di campionamento ha il vantaggio di permettere l'aspirazione di grandi volumi di aria confinata, minimizzando le differenze di distribuzione dei batteri dovute alle correnti, alla temperatura e alle dimensioni degli aggregati aerodispersi.

1.2.2. Risultati

1.2.2.1. Scelta del terreno colturale più idoneo al campionamento dei microrganismi della grotta

Il giorno 24/06/2020 è stato fatto un primo sopralluogo e campionamento. Per effettuare un campionamento passivo di aria sono stati utilizzati diversi terreni colturali agarizzati in grado di permettere lo sviluppo di funghi (Malt extract agar MEA, Rose bengal Agar RBA, Potato Dextrose Agar PDA) e di batteri (Plate count Agar PCA, Luria bertani agar LBA, Tryptic soy Agar TSA, Mineral Medium M9). I terreni sono stati esposti per circa 12 ore all'interno della grotta e successivamente incubati per 24 ore a 25 °C e 50 °C per valutare rispettivamente la carica microbica mesofila e termofila.

I risultati della lettura delle piastre hanno permesso di individuare i terreni LBA, PCA come i più idonei al campionamento delle specie microbiche presenti in grotta. Tuttavia gli elevati livelli di condensa sviluppatesi durante le 12 h di esposizione non hanno consentito una determinazione quantitativa della carica microbica.

1.2.2.2. Determinazione della carica microbica delle acque termali e del bioaerosol della grotta mediante campionamento passivo

Nei campionamenti successivi (1/07/2020 e 03/08/2020) è stato ripetuto un campionamento passivo in grotta, e tenuto conto delle indicazioni dell'attività riportata nel paragrafo 1.2.2.1 sono stati utilizzati solo i terreni LBA, PCA, i quali sono stati esposti per un tempo massimo di 2 ore e poi incubati nuovamente per 12 ore alle due temperature di riferimento.

In Tabella 7 vengono riportati i valori medi di carico microbico ottenuti da 3 campionamenti passivi condotti ciascuno in duplicato in grotta e nella piscina termale coperta.

	50°	°C	25°C		
	CFU/Piastra	CFU/m²/h	CFU/Piastra	CFU/m²/h	
LBA	55± 6	4330 ± 240	39 ± 8 CFU	3100 ± 300	
PCA	50± 2	3930 ± 80	36 ± 2 CFU	2830 ± 80	

Tabella 7. Valori di unità formanti colonie (CFU) per piastra e m²/h rivelate durante i campionamenti passivi.



Figura 18. Sviluppo di Piastre di Petri incubate a seguito del campionamento passivo condotto per 2 ore all'interno della grotta.

Dai risultati si evince come la carica presente nell'aerosol è in prevalenza di tipo termofilo, ma presumibilmente in grado di crescere anche in condizioni di mesofilia. Le colonie sviluppatesi sono prevalentemente di tipo batterico, le colonie fungine invece sono rare ma comunque presenti. Poiché sono molto rari gli studi di analisi della carica microbica del bioaerosol nelle grotte termali, la piscina termale è stata utilizzata come ambiente di confronto per il fatto di essere comunque un ambiente chiuso, con alto grado di umidità ma caratterizzato da una temperatura prossima ai 30 °C. I dati di carica microbica nell'ambiente di riferimento sono di circa la metà (2100 \pm 60 CFU/m²/h) per quanto riguarda la carica termofila, ma sono del tutto confrontabili per quel che riguarda la carica sviluppata in mesofilia (2517 \pm 25 su LBA CFU/m²/h e 3780 \pm 30 CFU/m²/h su PCA).

Lo stesso giorno è stato effettuato un campionamento dell'acqua della sorgente, la quale è presumibilmente la prima fonte di carica microbica della grotta.

Diverse aliquote di acqua termale sono state prelevate e filtrate in condizioni di sterilità su filtri con cut-off di 0.45 μ m.

I risultati delle conte colturali post incubazione (50 °C) hanno dato i seguenti risultati:

- 234 CFU/L su PCA
- 304 CFU/Lsu LBA

È da sottolineare che il carico microbico rivelato risulta essere estremamente basso, tuttavia è da tenere presente che normalmente, e ancor più negli ambienti estremi, solo una piccola parte delle comunità microbiche ambientali risulta essere coltivabile e pertanto non facilmente rivelabile con i tradizionali metodi di coltivazione su terreno agarizzato. Va sottolineato inoltre che essendo le sorgenti

termali delle sorgenti sotterranee, il quantitativo di ossigeno disciolto potrebbe essere molto limitato e pertanto supportare la crescita di microrganismi microaerofili o anaerobici che non trovano condizioni ideali di crescita in ambiente aerobico.

Al fine di verificare se il carico microbico riscontrato fosse realmente basso o se invece i bassi valori ottenuti fossero indicazione di una difficile coltivabilità dei microrganismi estremofili caratterizzanti le sorgenti termali, è stato utilizzato un secondo approccio di tipo molecolare che potesse prescindere dalla coltivazione.

In questo caso un volume noto di acqua (1 L) è stato filtrato (0.45 µm) al fine di raccogliere i microrganismi sulla membrana e conseguentemente è stato estratto il DNA metagenomico della comunità presente sul filtro. Mediante un approccio di amplificazione quantitativo (q-PCR) di regioni target sul DNA (16SrDNA e 18SrDNA rispettivamente per funghi e batteri) sono stati quantificati batteri e funghi presenti nel campione di acque termali. I risultati sono espressi in numero di copie (n°copie) di rDNA per litro di acqua analizzata, che è direttamente correlato al numero di microrganismi totali presenti.

I risultati confermano quanto atteso, la quantità di carica microbica batterica rivelata sulle acque termali risulta essere di diversi ordini di grandezza superiore $(3.55 \times 10^9 \text{ n}^\circ \text{copie } 16 \text{SrDNA/L})$ a quella riscontrata con i metodi basati sulla coltivazione. Il segnale di amplificazione relativo ai funghi è risultato essere decisamente basso $2 \times 10^2 \text{ n}^\circ \text{copie} 18 \text{SrDNA/L}$.

Alla luce di ciò risulta auspicabile uno studio metagenomico che possa caratterizzare a livello di specie e di genere l'intera comunità microbica sia coltivabile che non.

1.2.2.3. Determinazione della carica microbica del bioaerosol mediante campionamento attivo

La carica microbica del bioaerosol della grotta è stata quantificata anche mediante campionamento attivo, al fine di avere una stima quantitativa rispetto ai metri cubi di aria campionata. Il primo approccio è stato quello di utilizzare un campionatore a cascata (6 livelli) di tipo Andersen, che è in grado di campionare particelle di aerosol delle dimensioni comprese nel range 0.65-7µm. Il campionamento effettuato con questa modalità purtroppo non ha dato risultati ripetibili, probabilmente imputabile al fatto che, come evidenziato nella sezione precedente, le particelle di aerosol all'interno della grotta presentano una distribuzione bimodale (0.3 e 8 µm), con dimensioni che sono al di fuori del range di campionamento del campionatore Andersen. Durante l'aspirazione dell'aria le particelle più grandi hanno probabilmente creato un microfilm acquoso sulla superficie dell'impattore impedendone poi il successivo contatto con le piastre di Petri sottostanti. Inoltre, la bassa carica misurata, ripartita per i sei livelli dell'impattore ha dato risultati statisticamente non significativi (dati non mostrati).

A tal fine è stato provato un secondo approccio con un campionatore di aria monostadio (Microflow α , Aquaria), con cut-off di 1 mm, che risponde alle raccomandazioni indicate nel metodo UNICHIM n° 1962-2 del 2006 relativamente alla determinazione mediante campionatori attivi ad impatto ortogonale della contaminazione microbiologica dell'aria. In questo caso i risultati ottenuti campionando volumi di aria variabili (250-500 e 1000 L) hanno permesso di effettuare una stima più attendibile della carica microbica presente in grotta.

	50°C	25°C
Grotta	20±4 CFU/m ³	36 ±5 CFU/m ³
Piscina	8±2 CFU/m ³	162±12 CFU/m ³

Tabella 8. Carica microbica rivelata con campionamento attivo di aria nella grotta e piscina termale

Dai risultati si evince come la carica mesofila caratterizzante la grotta sia significativamente più bassa rispetto a quella rivelata in piscina. Questo a conferma che l'ambienta grotta risulta essere un ambiente estremo dove la proliferazione delle specie mesofile è fortemente limitata e dove prevalgono forme termofile, presumibilmente in grado di crescere anche in condizioni di mesofilia.

In accordo con i documenti INAIL (<u>https://www.inail.it</u>, Strategie di monitoraggio dell'inquinamento di origine biologica dell'aria in ambienti indoor) sugli indici di riferimento della qualità dell'aria che definisce 5 categorie di inquinamento microbatteriologico degli ambienti (da Molto bassa, bassa, intermendia, alta e molto alto), l'aerosol della grotta è risultato avere un livello di contaminazione definito "Molto basso".

I risultati mostrati in questa sezione danno indicazione del fatto che specie mesofile potenzialmente introdotte in grotta attraverso l'entrata di pazienti, hanno poche possibilità di sopravvivenza e comunque non trovano un ambiente adatto alla proliferazione, diversamente da quanto avviene invece in piscina.

1.2.2.4. Biodiversità microbica della comunità coltivabile aerodispersa presente in grotta e possibili potenzialità applicative

Nonostante i campionamenti passivo e attivo abbiano rivelato entrambi una bassa carica microbica, 10 morfotipi differenti sono stati individuati durante le fasi di isolamento (Figura 19).



Figura 19. Morfotipi isolati in coltura pura dall'aerosol delle grotte termali.

Ciò sta ad indicare che seppur ci siano dei morfotipi prevalenti (TERM_D e TERM_E, i quali da un'attenta analisi morfologica microscopica sono risultati essere lo stesso ceppo), la comunità microbica coltivabile è comunque caratterizzata da una buona biodiversità. Fra tutti gli isolati si distinguono due funghi filamentosi TERM_I e TERM_G e fra i batteri alcuni batteri filamentosi (TERM_B e _H) (Actinomiceti) (Figura 20).



Figura 20. Immagini al microscopio ottico di colonie filamentose Ingrandimento 100X

È da sottolineare che 3 fra i diversi morfotipi individuati hanno mostrato proprietà particolarmente interessanti che meritano ulteriore attenzione.

In particolare, l'isolato TERM_1 si è rivelato interessante per la produzione di esopolisaccaride. Le caratteristiche morfologiche delle colonie erano caratterizzate da un ampio strato mucillagginoso indicativo della produzione del polisaccaride a livello extracellulare (Figura 20). La produzione è stata verificata anche mediante coltivazione su terreno liquido (dati non mostrati). È da sottolineare che molti esopolisaccaridi (EPS) di origine microbica trovano applicazione nel settore cosmetico e farmaceutico come addensanti stabilizzanti immunostimolanti e come vettori biopolimerici per rilascio controllato [2].

Il secondo morfotipo di interesse è risultato essere l'isolato TERM_2, il quale già in fase di isolamento si era distinto per aver creato intorno a sé un alone di inibizione verso altre forme batteriche, indicativo della possibile produzione di sostanze antibatteriche. La possibile produzione di sostanze antibiotiche è stata verificata conducendo un test per la produzione di sostanze antibiotiche in piastra utilizzando come microrganismi indicatori un ceppo Gram – (*E.coli*) e un ceppo Gram + (*B.cereus*). La Figura 21, conferma la capacità dell'isolato TERM_2 di produrre sostanze con attività antibiotica verso microrganismi GRAM +. In questo contesto, la crescente ricerca di nuovi composti ad attività antibiotica ha recentemente

dimostrato che le sorgenti termali sono ricche di attinomiceti termofilici, microrganismi in grado di produrre sostanze antibiotiche [3, 4].

Il terzo morfotipo che merita ulteriore approfondimento per le possibili potenzialità applicative è risultato l'Isolato TERM_I. In questo caso si tratta di un isolato fungino con capacità di rilasciare a livello extracellulare un pigmento di color purpureo.

Molti dei pigmenti microbici non solo agiscono come agenti coloranti nel settore alimentare e cosmetico, ma possiedono anche attività antitumorali, antiossidanti, antinfiammatorie e antimicrobiche [5].



Figura 21. Morfotipi di potenziale interesse.

2. Valutazione del rischio di contagio da SARS-CoV-2 nella grotta termale

Introduzione

In questa sezione verrà valutato il rischio di contagio da SARS-CoV-2 all'interno della grotta attraverso un modello di valutazione del rischio recentemente proposto in letteratura scientifica [6, 7]. Il modello è basato sulla quantificazione del tasso di emissione di "quanta" di SARS-CoV-2 in funzione di diverse attività respiratorie, parametri respiratori e livelli di attività fisica. Un "quanta" è la dose di nuclei di goccioline trasportati dall'aria necessari per causare l'infezione nel 63% di soggetti suscettibili [6]. Il modello utilizza questo tasso di emissione di quanta al fine di simulare il rischio di infezione individuale associato a scenari di esposizione personalizzati e il numero medio di persone infette risultanti da questo scenario (R₀, numero di riproduzione di base).

Il modello calcola i singoli rischi di infezione e i livelli di occupazione massima degli ambienti indoor per un massimo di otto ore di esposizione totale specificando le seguenti condizioni:

- Caratteristiche di uno o più individui infettivi che entrano e escono da un ambiente indoor in momenti diversi o sovrapposti;
- Caratteristiche di un soggetto suscettibile esposto che entra ed esce dall'ambiente indoor in determinati orari;
- Rateo di emissione virale per ciascun individuo infettivo e il rateo di inalazione per il soggetto suscettibile;
- Dimensioni dell'ambiente indoor occupato e rateo di rimozione virale infettiva che tiene conto di tre meccanismi: deposizione di particelle, inattivazione virale e ricambi orari di aria specifici del sito.

Il modello fornisce i seguenti dati relativi ai rischi associati all'occupazione di uno spazio indoor quando si verifica la trasmissione per via aerea di un agente patogeno come SARS-CoV-2:

- Rischio di infezione individuale associato a diversi tempi di permanenza nell'ambiente indoor;
- Numero massimo di occupanti per il quale si ha un numero di riproduzione di base (R₀) inferiore a uno (condizione necessaria per evitare che l'esposizione contribuisca ulteriormente alla diffusione della malattia).

2.1. Descrizione dell'approccio modellistico

L'approccio modellistico implementato e descritto in questa sezione segue direttamente da recenti pubblicazioni scientifiche [6, 7].

Il modello utilizzato per quantificare il rischio di infezione nell'aria implementato nel presente approccio è stato sviluppato da Gammaitoni e Nucci [8] ed è stato applicato con successo in precedenti lavori per stimare il rischio di infezione dovuto a diverse malattie (ad esempio influenza, SARS, tubercolosi, rinovirus) in vari contesti come aeroplani [9], automobili [10] e ospedali. Il modello calcola la concentrazione nel tempo di quanta, n(t), in un ambiente indoor, soggetto a un tasso costante di emissioni e rimozione. L'equazione completa per n(t), incluso un termine di concentrazione iniziale (n_0), è presentata di seguito:

$$n(t)\left(\frac{quanta}{m^3}\right) = n_0 e^{-IVR \cdot t} + \frac{ER_q \cdot I}{IVRR \cdot V} (1 - e^{-IVRR \cdot t})$$

dove *IVRR* (h⁻¹) rappresenta il tasso totale di rimozione virale infettiva, *I* è il numero di soggetti infettivi, *V* è il volume dell'ambiente indoor ed *ER*^{*q*} è il tasso di emissione di quanta sopra citato (quanta h⁻¹) caratteristico del virus specifico in studio. Il termine *IVRR* è la somma di tre contributi, tutti espressi in h⁻

¹: il ricambio orario di aria tramite ventilazione (*AER* – air exchange ratio), il tasso di deposizione di particelle sulle superfici (*k*, ad esempio per via della sedimentazione gravitazionale) e il tasso di inattivazione virale (λ). I dettagli su questi tre parametri sono specificati nelle sezioni successive.

Oltre ai valori ER_q e *IVRR* costanti, si presume che il periodo latente della malattia sia più lungo della scala temporale del modello e che le goccioline siano distribuite istantaneamente e uniformemente nella stanza, usando l'approccio di tipo "box model" descritto da Gammaitoni e Nucci [8]. Quest'ultimo rappresenta un presupposto fondamentale per l'applicazione del modello in quanto impone l'ipotesi che l'aria sia perfettamente mescolata all'interno dello spazio modellato. Il rischio associato all'esposizione dipende dalla dose di quanta e dalla durata dell'esposizione, nonché dalla probabilità che si verifichi questa condizione di esposizione. La dose di quanta (D_q) ricevuta da un soggetto suscettibile può essere ottenuta integrando la concentrazione di quanta calcolata nel tempo di esposizione totale (t), come segue:

$$D_q(quanta) = IR \int_0^t n(t)dt$$

dove *IR* è il rateo di inalazione del soggetto esposto (m³/ora) che è una funzione del livello di attività. Per determinare la probabilità di infezione (P_I , %) degli occupanti suscettibili esposti, viene utilizzato un modello esponenziale dose-risposta. Infine, il rischio di infezione individuale riscontrato da un soggetto esposto può essere calcolato come il prodotto della probabilità di infezione (P_I , %) per la probabilità di insorgenza (P_P , %) di tale valore. Queste due equazioni sono presentate di seguito:

$$P_I (\%) = (1 - e^{-D_q})$$

 $R (\%) = P_I \cdot P_P$

Per la valutazione di P_P si ipotizza una probabilità uniforme del 15 % sulla base del fatto che nel modello viene utilizzato l'85° percentile del tasso di emissione di quanta (ER_q). Il valore dell'85° percentile è stato selezionato analizzando i risultati di simulazioni Monte Carlo su una serie di scenari di esposizione, dai quali si è osservato che il valore massimo di rischio individuale si verifica in un intervallo ristretto di valori dell'84° - 90° percentile. Il modello, in questo modo, stima prudenzialmente il massimo rischio individuale per un individuo esposto.

Il numero di riproduzione di base R_0 , che rappresenta il numero di persone suscettibili infette dopo il tempo di esposizione, può essere determinato moltiplicando la probabilità di infezione (P_1 , %) per il numero di individui esposti. In questo modello, inoltre, R_0 è stato utilizzato anche al fine di fornire il numero massimo di occupanti che manterrebbe il suo valore al di sotto di 1 per lo scenario in esame. In questo modo si può ottenere un valore di occupazione massima o un indice di affollamento usando la seguente equazione, arrotondata per difetto all'intero più vicino:

Max. Occupants for
$$R_0(t) < 1 = \frac{1}{P_I(t)}$$

2.2. Parametri del modello e scenari ipotizzati

In questa sezione vengono descritti i parametri e gli scenari utilizzati per il calcolo del rischio di infezione all'interno della grotta. I parametri impostati come dati di input del modello, descritti in dettaglio in seguito, sono: volume della grotta (V); tasso totale di rimozione virale infettiva (IVRR), che è somma del numero di ricambi orari (AER), del tasso di deposizione delle particelle sulle superfici (k) e del rateo di inattivazione virale (λ); concentrazione iniziale di quanta (n_0); tempo totale di occupazione della grotta (t).

Il volume della grotta è stato calcolato direttamente da misure effettuate sul luogo e risulta pari a 34 m³ mentre il numero di ricambi orari è stato ottenuto dalle specifiche tecniche dell'impianto di ventilazione installato (260 m³/h) maggiorato di 0.2 h⁻¹ per tenere conto delle infiltrazioni derivanti dalla parziale apertura del lucernario, per un totale di AER pari a 7.78 h⁻¹. Il rateo di deposizione delle particelle (k) è stato posto pari a 0.24 h⁻¹ come proposto da Buonanno et al. [6] i quali calcolano il tasso di deposizione come rapporto tra la velocità di sedimentazione delle particelle super-micrometriche (particelle il cui diametro è maggiore di 1 μm, circa 1.0×10⁻⁴ m s⁻¹ misurata da Chatoutsidou e Lazaridis [11]) e l'altezza della sorgente di emissione (1.5 m). il rateo di inattivazione virale (λ) è stato posto pari a 0.63 h⁻¹ sulla base del valore dall'emivita di SARS-CoV-2 (1.1 ore) rilevata da van Doremalen et al. [12] come segue:

$$\lambda(h^{-1}) = \frac{0.693}{t_{1/2}}$$

La concentrazione iniziale di quanta (n_0) e il tempo totale di occupazione della grotta (t), infine sono stati posti pari rispettivamente a zero e 8 ore (valore massimo implementabile nel modello). I parametri descritti sono riportati in Tabella 9.

Tabella 9. Sommario dei dati di input utilizzati nel modello per il calcolo del rischio di infezione in grotta.

V (m³)	AER (h ⁻¹)	k (h⁻¹)	λ (h⁻¹)	n ₀ (quanta/m³)	t (min)
34	7.78	0.24	0.63	0	480

Per quanto riguarda gli scenari ipotizzati, questi sono stati implementati impostando i seguenti parametri: tempo di ingresso e uscita dalla grotta e tasso di emissione di quanta dei soggetti infettivi (ER_q) ; tempo di ingresso e uscita dalla grotta e rateo di inalazione (IR) del soggetto suscettibile. Il rateo di emissione di quanta dei soggetti infettivi, specifico per SARS-CoV-2, dipende dal tipo di attività del soggetto stesso e rappresenta, come specificato, l'85° valore percentile di un set di dati distribuito in modo log-normale (base 10), come riportato in Buonanno et al. [6]. La complessa metodologia di calcolo di ER_q è descritta in dettaglio in Buonanno et al. [6] e non viene qui riportata per ragioni di sintesi. Tutti i valori di IR per il soggetto suscettibile sono forniti da Buonanno et al. [6, 7].

Gli scenari ipotizzati nel presente lavoro sono i seguenti: il primo (scenario 1) prevede l'ingresso in grotta consecutivamente di due soggetti infettivi, per un tempo di permanenza per ciascuno pari a 15 minuti, e successivo ingresso in grotta del soggetto suscettibile, con un tempo di permanenza di quest'ultimo pari a 15 minuti; il secondo (scenario 2) prevede l'ingresso e la permanenza di due soggetti infettivi e un soggetto suscettibile contemporaneamente per 15 minuti. Nel primo scenario tutti gli occupanti sono stati considerati come a riposo (seduti) e caratterizzati dalla sola attività respiratoria, mentre nel secondo gli occupanti sono considerati in piedi e che parlano tra loro. Entrambi gli scenari sono stati implementati in due ipotesi: la prima considerando il sistema di ventilazione in funzione e lucernario semi-aperto; il secondo considerando il sistema di ventilazione spento e il lucernario chiuso. Nella seconda ipotesi è stato comunque imposto un valore di AER pari a 0.2 h⁻¹ per tenere conto delle infiltrazioni attraverso le porte. I dettagli degli scenari simulati sono riportati in Tabella 10.

Tabella 10. Dettagli degli scenari di esposizione in grotta implementati in entrambi i casi di sistema di ventilazione attivato e disattivato (t_{in} = istante di ingresso in grotta, t_{out} = istante di uscita dalla grotta, ER_q = rateo di emissione di quanta, IR = rateo di inalazione).

	Soggetto infettivo 1			Soggetto infettivo 2		Soggetto suscettibile			
	t _{in} (min)	t _{out} (min)	ER _q (quanta/h)	t _{in} (min)	t _{out} (min)	ER _q (quanta/h)	t _{in} (min)	t _{out} (min)	IR (m³/h)
Scenario 1	0	15	2.0	15	30	2.0	30	45	0.49
Scenario 2	0	15	11.4	0	15	11.4	0	15	0.54

2.3. Risultati delle simulazioni

I risultati delle simulazioni sono riportati in termini di rischio per l'occupante suscettibile (relativamente al suo tempo di permanenza) e per le persone suscettibili che occupano lo spazio per l'intera simulazione (ovvero per il tempo totale di occupazione). Sono riportati i seguenti valori:

- Tempo di esposizione (t_{exp}): per il soggetto suscettibile questo sarà il tempo di uscita meno il tempo di entrata in minuti. Per l'occupazione continua sarà uguale al tempo totale di occupazione;
- Rischio di infezione individuale (*R*, %): il rischio di infezione individuale rappresenta la probabilità percentuale di infezione individuale per l'esposizione al profilo di concentrazione dei quanta integrato nel tempo di esposizione;
- Tempo di esposizione per un rischio dello 0.1% (t_{exp,0.1}): questo valore è il tempo di esposizione in minuti associato a una probabilità di infezione dello 0.1%. Se il tempo di esposizione è inferiore a questo valore, il modello stima che il rischio sia inferiore allo 0.1% e viceversa. Il profilo di concentrazione dei quanta per il soggetto suscettibile sarà diverso da quello relativo all'occupazione continua; pertanto, i tempi di esposizione calcolati possono essere diversi. Se il soggetto suscettibile o l'occupazione continua non superano la soglia di rischio dello 0.1% durante la simulazione, il modello presenta un risultato maggiore (">") del tempo di esposizione modellato;
- Tempo di esposizione per un rischio dell'1% (t_{exp,1}): questo valore ha le stesse caratteristiche del parametro di cui sopra, ma utilizza una soglia di rischio più elevata (1%). Per definizione, il tempo di esposizione calcolato per il rischio dell'1% sarà superiore a quello del rischio dello 0.1%. L'uso della soglia di rischio più bassa è riportata nel caso si voglia riferire la simulazione al calcolo del rischio per persone più deboli (anziani), mentre la soglia più alta può essere appropriata per una coorte di individui più giovani e sani;
- Occupazione massima della grotta per R₀ <1 (O_{max,R<1}): questo parametro rappresenta il numero massimo di occupanti teoricamente consentiti nella grotta per il tempo di esposizione e il profilo di concentrazione dei quanta dello scenario designato (soggetto suscettibile e occupazione continua) al fine di mantenere il numero di riproduzione di base (*R₀*) inferiore a 1 per tale esposizione. In altre parole, ci si può aspettare che più di una persona si possa infettare se l'occupazione dovesse aumentare oltre questo numero. Concettualmente, per il calcolo continuo dell'occupazione, questo parametro rappresenta il numero consentito di occupanti che saranno presenti per l'intera simulazione. Per il soggetto suscettibile, invece, il calcolo dell'occupazione massima della stanza si applica a una coorte di persone che condividono lo stesso profilo di esposizione del soggetto suscettibile (ovvero entrare e uscire contemporaneamente dalla grotta).

	Sogg	etto susce	ttibile			Occupazione continua			
t _{exp} (min)	R (%)	t _{exp,0.1} (min)	t _{exp,1} (min)	Omax,R0<1	t _{exp} (min)	R (%)	t _{exp,0.1} (min)	t _{exp,1} (min)	Omax,R0<1
15	0.01	>15	>15	2742	480	0.02	>480	>480	605

Tabella 11. Risultati della simulazione per lo scenario 1 considerando il sistema di ventilazione attivo.

Tabella 12. Risultati della simulazione per lo scenario 1 considerando il sistema di ventilazione non attivo.

	Soggetto suscettibile					Occu	pazione co	ontinua	
t _{exp} (min)	R (%)	t _{exp,0.1} (min)	t _{exp,1} (min)	O _{max,R0<1}	t _{exp} (min)	R (%)	t _{exp,0.1} (min)	t _{exp,1} (min)	O _{max,R0<1}
15	0.04	>15	>15	386	480	0.20	54	>480	75

Tabella 13. Risultati della simulazione per lo scenario 2 considerando il sistema di ventilazione attivo.

Soggetto suscettibile						Occupazione continua				
t _{exp} (min)	R (%)	t _{exp,0.1} (min)	t _{exp,1} (min)	O _{max,R0<1}	t _{exp} (min)	R (%)	t _{exp,0.1} (min)	t _{exp,1} (min)	O _{max,R0<1}	
15	0.1	>15	>15	156	480	0.15	15	>480	96	

Tabella 14. Risultati della simulazione per lo scenario 2 considerando il sistema di ventilazione non attivo.

Soggetto suscettibile						Occupazione continua				
t _{exp} (min)	R (%)	t _{exp,0.1} (min)	t _{exp,1} (min)	Omax,R0<1	t _{exp} (min)	R (%)	t _{exp,0.1} (min)	t _{exp,1} (min)	Omax,R0<1	
15	0.16	11	>15	91	480	1.21	11	103	12	

Per facilitare la visualizzazione dei risultati del modello e di come tali risultati variano nel tempo in base ai parametri immessi, vengono di seguito presentati dei grafici che includono le seguenti informazioni:

- La concentrazione di quanta calcolata nella grotta in quanta/m³;
- Il rischio di infezione individuale per il soggetto suscettibile;
- Il rischio di infezione individuale per una persona che occupa continuamente la grotta per tutto il tempo simulato (8 ore);
- L'occupazione massima teorica calcolata per mantenere $R_0 < 1$ per l'occupazione continua della grotta (numero di occupanti ammissibili per una coorte che entra all'istante zero).



Figura 22. Andamento temporale dei risultati della simulazione per lo <u>scenario 1</u> considerando il <u>sistema di</u> <u>ventilazione attivo</u>.



Figura 23. Andamento temporale dei risultati della simulazione per lo <u>scenario 1</u> considerando il <u>sistema di</u> <u>ventilazione non attivo</u>.



Figura 24. Andamento temporale dei risultati della simulazione per lo <u>scenario 2</u> considerando il <u>sistema di</u> <u>ventilazione attivo</u>.



Figura 25. Andamento temporale dei risultati della simulazione per lo <u>scenario 2</u> considerando il <u>sistema di</u> <u>ventilazione non attivo</u>.

L'analisi dei dati riportati consente di caratterizzare la grotta dal punto di vista del rischio di infezione sotto le ipotesi del modello e per gli scenari considerati. In primo luogo, considerando i dati riportati, si evidenzia l'effetto determinante del sistema di ventilazione meccanica sul rischio di contagio: per entrambi gli scenari ipotizzati, si assiste ad una riduzione sostanziale del rischio di contagio considerando il sistema di ventilazione attivo (sia per il singolo soggetto suscettibile nei 15 minuti di permanenza in grotta che per l'occupazione continuativa). Tale effetto è reso ancora più evidente dal parametro relativo all'occupazione massima della grotta che passa dal valore teorico di 75 a quello di 605 per lo scenario 1 e da 12 a 96 per lo scenario 2 (occupazione continua). Si vuole, tuttavia, evidenziare il ruolo puramente teorico, anche se significativo, di questo parametro (è inverosimile, infatti, la contemporanea presenza di più occupanti di quanti la superficie di un ambiente indoor ne consentirebbe nelle condizioni in cui il rischio fosse particolarmente basso).

Dall'analisi dei risultati, inoltre, appare evidente che l'adozione di misure di distanziamento sociale quale l'accesso non contemporaneo alla grotta di più persone (scenario 1) renda estremamente basso il rischio di contagio, secondo le ipotesi alla base del modello, anche con il sistema di ventilazione meccanica

non attivo. Una condizione modellata che presenta un rischio relativamente alto per il singolo soggetto suscettibile, è quella relativa allo scenario 2 con il sistema di ventilazione non attivo e la presenza di due soggetti infettivi e uno suscettibile contemporaneamente nella grotta che parlano tra loro. In questo caso, infatti, ammettendo una probabilità di infezione dello 0.1%, il tempo di esposizione massima risulta minore del tempo di permanenza di 15 minuti del soggetto suscettibile (11 minuti). Per lo scenario 1, invece, con il sistema di ventilazione non attivo il tempo massimo di esposizione risulta minore del tempo massimo (54 minuti su 480) ad evidenziare ancora una volta il ruolo determinante del sistema di ventilazione meccanica.

Dall'analisi delle figure 22, 23, 24 e 25, infine, si nota come il sistema di ventilazione meccanica determina una riduzione repentina della concentrazione di quanta nella grotta e della conseguente riduzione del rischio di contagio con contestuale aumento dell'occupazione massima (si noti che nella Figura 22 la curva relativa all'occupazione massima risulta fuori scala e quindi non è visualizzata).

Si vuole in ogni caso evidenziare il principale limite del presente modello che risiede nell'approccio di tipo "box model" secondo il quale l'aria è perfettamente mescolata e, di conseguenza, la concentrazione nel tempo diventa uniforme nello spazio. Secondo questo approccio gli individui suscettibili sono quindi esposti alla stessa concentrazione indipendentemente dalla loro posizione nella grotta. Le differenze nel rischio di esposizione tra occupanti suscettibili sono quindi ridotte a una funzione della durata dell'esposizione piuttosto che alla loro posizione nella grotta. Alla luce di queste ipotesi semplificative, l'accuratezza del modello dipende dalla scala spaziale analizzata. In generale, più piccolo è lo spazio chiuso, più l'aria risulta mescolata e quindi più i risultati si avvicinano alla realtà.

Conclusioni e prospettive future

Alla luce dei risultati riportati nelle precedenti sezioni si possono trarre le seguenti conclusioni:

- La caratterizzazione dell'aerosol all'interno della grotta termale ha mostrato differenze sostanziali tra l'ambiente grotta e le aree esterne ad essa. In particolare sono state osservate differenze fino a quattro ordini di grandezza tra la concentrazione totale interna e quella di background in termini di massa delle particelle. Non sono state osservate, al contrario, variazioni apprezzabili tra le stesse misure effettuate in diversi giorni e orari. La distribuzione dimensionale delle particelle, inoltre, ha mostrato una netta prevalenza di particelle le cui dimensioni sono superiori a circa 7-8 μm, con tuttavia una frazione significativa anche al di sotto dei 0.3 μm (limite inferiore di rilevabilità dello strumento utilizzato).
- Il bioaerosol delle grotte termali è caratterizzato da una bassa carica microbica, in prevalenza composta da microrganismi di tipo batterico, più scarsa è la presenza di funghi. L'ambiente grotta risulta un ambiente scarsamente contaminato dal punto di vista microbiologico, con prevalenza di ceppi non coltivabili generatesi dall'aerosolizzazione delle acque termali. La biodiversità riscontrata nella comunità microbica aerodispersa e coltivabile è comunque alta. Nonostante, durante il presente studio non sono state condotte attività sperimentali mirate alla ricerca di composti microbici naturali, lo studio ha consentito già da un'indagine preliminare, di mettere in luce proprietà di potenziale applicazione nel settore cosmetico-farmaceutico dei microrganismi isolati dalle grotte termali.
- Dal punto di vista del rischio di infezione, valutato sotto le ipotesi del modello, si evidenzia l'effetto determinante del sistema di ventilazione meccanica sul rischio di contagio: per entrambi gli scenari ipotizzati, si assiste ad una riduzione sostanziale del rischio di contagio considerando il sistema di ventilazione attivo. Inoltre, l'adozione di misure di distanziamento sociale quale l'accesso non contemporaneo alla grotta di più persone rende estremamente basso il rischio di contagio, secondo le ipotesi alla base del modello, anche con il sistema di ventilazione meccanica non attivo.

I risultati del presente studio saranno esposti come comunicazione al convegno MinWat 3rd International Multidisciplinary Conference on mineral and thermal Water che si terrà a Caserta dal 21 al 25 Marzo 2021(<u>https://minwatitaly2020.org/</u>)

Di seguito vengono elencate possibili linee di sviluppo del presente studio:

- Analisi delle caratteristiche fisiche dell'aerosol in grotta nell'intervallo 6 nm 0.3 μm al fine di completare le distribuzioni dimensionali riportate nel presente studio dato che queste ultime hanno mostrato la possibile significativa presenza di particelle sub-micrometriche. Per via delle condizioni termo-igrometriche interne alla grotta particolarmente gravose, tali misure saranno effettuate mediante linea di campionamento dedicata e sistema di condizionamento termico e diluizione del campione prelevato con successiva misura mediante contatori (e.g. CPC, condensation particle counters) e analizzatori di mobilità differenziale (e.g. FMPS, fast mobility particle sizers).
- 2. Caratterizzazione tassonomica dei morfotipi individuati: I 10 morfotipi isolati dal bioaersol della grotta possono essere identificati dal punto di vista molecolare per risalire al genere e alla specie. In questo caso si potrebbe rivelare la presenza di specie uniche e interessanti o non ancora caratterizzate che hanno possibilità di essere isolate in ambienti così ancora inesplorati dal punto di vista microbico come il bioaerosol delle grotte termali.
- 3. Caratterizzazione metagenomica della comunità microbica presente nelle acque termali e in grotta. Poiché l'ambiente della grotta e della sorgente termale sono caratterizzati da proprietà chimico fisico uniche, la coltivabilità dei microrganismi presenti risulta essere limitata con approcci di microbiologia tradizionale. Uno studio metagenomico, basato sul sequenziamento di nuova generazione (NGS) che includa l'estrazione del DNA dell'intera comunità (coltivabile e non coltivabile) potrebbe dare una dettagliata descrizione delle specie presenti nella grotta e nell'acqua termale.
- 4. Persistenza di ceppi mesofili in grotta. La presenza di condizioni microclimatiche particolari può determinare un habitat favorevole o viceversa sfavorevole alla sopravvivenza e alla riproduzione di miceti e batteri nell'aria. Risulta auspicabile studiare il meccanismo di decadimento e permanenza di ceppi mesofili esogeni e veicolati dall'uomo nelle condizioni tipiche della grotta termale.
- Persistenza di un virus batteriofago surrogato del SARS-CoV-2. Il meccanismo di decadimento del SARS-CoV-2 può essere studiato senza alcun rischio per la salute umana utilizzando batteriofagi con classe di rischio 1 (e.g. Φ6) che, da letteratura scientifica, presentano caratteristiche di decadimento analoghe a quelle dei Coronavirus [13].
- 6. Simulazioni CFD (computational fluid dynamics) dei campi di moto e di distribuzione spaziale dell'aerosol in grotta al fine di valutare in maniera puntuale la variazione spaziale del rischio di infezione senza la necessità di adoperare la semplificazione dell'approccio di tipo "box model" nel modello di valutazione del rischio.

Bibliografia

- International Commission on Radiological Protection, Human respiratory tract model for radiological protection. A report of a Task Group of the International Commission on Radiological Protection. Annals of the ICRP: 1994; Vol. 24, pp 1-482.
- Yildiz, H., Karatas, N. Microbial exopolysaccharides: Resources and bioactive properties (2018) Process Biochemistry, 72, pp. 41-46.
- [3] Mahajan G. B. and Balachandran L. Sources of antibiotics: Hot springs, Biochemical Pharmacology, 134, 2017.
- Pednekar P, Jain R, Mahajan G. Anti-infective Potential of Hot-spring Bacteria. J Glob Infect Dis. 2011 Jul;3(3):241-5.
- Kalra R, Conlan XA, Goel M. Fungi as a Potential Source of Pigments: Harnessing Filamentous Fungi. Front Chem. 2020 May 8;8:369. doi: 10.3389/fchem.2020.00369. PMID: 32457874; PMCID: PMC7227384.
- [6] Buonanno, G.; Stabile, L.; Morawska, L. Estimation of Airborne Viral Emission: Quanta Emission Rate of SARS-CoV-2 for Infection Risk Assessment. Environment International 2020. <u>https://doi.org/10.1101/2020.04.12.20062828</u>.
- [7] Buonanno, G.; Morawska, L.; Stabile, L. Quantitative Assessment of the Risk of Airborne Transmission of SARS-CoV-2 Infection: Prospective and Retrospective Applications. Environment International 2020. <u>https://doi.org/10.1101/2020.06.01.20118984</u>.
- [8] Gammaitoni, L., Nucci, M.C., 1997. Using a Mathematical Model to Evaluate the Efficacy of TB Control Measures. Emerg. Infect. Dis. 335–342.
- [9] Wagner, B.G., Coburn, B.J., Blower, S., 2009. Calculating the Potential for Within-Flight Transmission of Influenza A (H1N1). BMC Med. 7, 81. <u>https://doi.org/10.1186/1741-7015-7-81</u>.
- [10] Knibbs, L.D., Morawska, L., Bell, S.C., Grzybowski, P., 2011. Room Ventilation and the Risk of Airborne Infection Transmission in 3 Health Care Settings Within a Large Teaching Hospital. Am. J. Infect. Control 39, 866–872.
- [11] Chatoutsidou, S.E., Lazaridis, M., 2019. Assessment of the Impact of Particulate Dry Deposition on Soiling of Indoor Cultural Heritage Objects Found in Churches and Museums/Libraries. J. Cult. Heritage 39, 221–228. <u>https://doi.org/10.1016/j.culher.2019.02.017</u>.
- [12] van Doremalen, N., Bushmaker, T., Morris, D.H., Holbrook, M.G., Gamble, A., Williamson, B.N., Tamin, A., Harcourt, J.L., Thornburg, N.J., Gerber, S.I., Lloyd- Smith, J.O., de Wit, E., Munster, V.J., 2020. Aerosol and Surface Stability of SARSCoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. N. Engl. J. Med. <u>https://doi.org/10.1056/NEJMc2004973</u>.
- [13] Aquino de Carvalho, N., Stachler, E. N., Cimabue, N., & Bibby, K. (2017). Evaluation of Phi6 persistence and suitability as an enveloped virus surrogate. Environ. Sci. Technol., 51(15), 8692-8700. <u>https://doi.org/10.1021/acs.est.7b01296</u>.

UNITUS: BASSA LA TRASMISSIONE SARS-CoV-2 IN GROTTA TERMALE

E' stato recentemente pubblicato sulla rivista scientifica internazionale "Environmental Geochemistry and Health" (Springer) uno studio svolto del gruppo di lavoro CINTEST/I-SUM dell'Università della Tuscia mirato a stimare il rischio di trasmissione di SARS-CoV-2 all'interno di una Grotta Naturale Termale. I dati per stimare il rischio di trasmissione di SARS-CoV-2 hanno utilizzato un modello matematico recentemente pubblicato in letteratura. Lo studio ha evidenziato la presenza di un aerosol con particelle di diametro maggiore di 8 µm, associabili pertanto ad un'elevata velocità di sedimentazione che riduce il tempo di permanenza di un potenziale agente biologico nell'ambiente e conseguentemente il rischio di trasmissione per via aerea. Dal punto di vista microbiologico, lo studio ha rivelato una buona qualità dell'aria nella grotta termale, con un bioaerosol caratterizzato da una bassa carica microbica. In generale, il modello matematico applicato a diversi scenari di affollamento della grotta, ha stimato un basso rischio di trasmissione di SARS-CoV-2, garantito alternativamente da un sistema di ventilazione attivo o dal distanziamento sociale. Il gruppo di lavoro I-SUM, costituito da ricercatori provenienti da diversi ambiti scientifici, dalla fisica, alla biologia, alle tecniche di misura, all'ingegneria e all'economia, è stato attivato ad inizio pandemia per supportare le imprese nella riconversione aziendale per la produzione di dispositivi di protezione individuale e in attività di studio correlate alla trasmissione del SARS-CoV-2. La ricerca in oggetto, cofinanziata da Terme dei Papi SpA di Viterbo, ha previsto la caratterizzazione dell'aerosol e della componente biologia nella grotta naturale termale in termini di distribuzione e dimensione delle particelle aerosolizzate.

ORIGINAL PAPER



Characterization of the bioaerosol in a natural thermal cave and assessment of the risk of transmission of SARS-CoV-2 virus

Mauro Scungio () · Silvia Crognale () · Davide Lelli · Eleonora Carota () · Giuseppe Calabrò ()

Received: 21 October 2020/Accepted: 19 February 2021 © The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2021

Abstract Thermal caves represent an environment characterized by unique chemical/physical properties, often used for treatment and care of musculoskeletal, respiratory, and skin diseases.

However, these environments are poorly characterized for their physical and microbiological characteristics; furthermore, the recent pandemic caused by COVID-19 has highlighted the need to investigate the potential transmission scenario of SARS-CoV-2 virus in indoor environments where an in-depth analysis of the aerosol concentrations and dimensional distributions are essential to monitor the spread of the virus.

This research work was carried out inside a natural cave located in Viterbo (Terme dei Papi, Italy) where a waterfall of sulfur–sulfate–bicarbonate–alkaline earth mineral thermal water creates a warm-humid environment with 100% humidity and 48 °C temperature. Characterization of the aerosol and bioaerosol was

Supplementary information The online version contains supplementary material available at (https://doi.org/10.1007/s10653-021-00870-w)

M. Scungio · G. Calabrò Department of Economics, Engineering, Society and Business Organization (DEIM), University of Tuscia, Via del Paradiso 47, Viterbo, Italy

S. Crognale · D. Lelli · E. Carota (⊠) Department for Innovation in Biological, Agro-Food and Forest Systems (DIBAF), University of Tuscia, Via San Camillo de Lellis, Viterbo, Italy e-mail: carota@unitus.it carried out to estimate the personal exposure to aerosol concentrations, as well as particle size distributions, and to give an indication of the native microbial load.

The data obtained showed a predominance of particles with a diameter greater than 8 μ m, associated with low ability of penetration in the human respiratory system. A low microbial load was also observed, with a prevalence of noncultivable strains generated by the aerosolization of the thermal waters.

Finally, the estimation of SARS-CoV-2 infection risk by means of mathematical modeling revealed a low risk of transmission, with a decisive effect given by the mechanical ventilation system, which together with the adoption of social distancing measures makes the risk of infection extremely low.

Keywords Thermal cave · Bioaerosol · Risk of transmission · SARS-CoV-2 virus · Viral droplets · Atypical indoor environments

Introduction

Thermal facilities, such as caves, swimming pools, and SPAs, represent an environment characterized by unique chemical/physical properties, such as the high concentration of mineral salts and dissolved gases, peculiar temperatures and pH. Depending on the content of specific elements in the thermal waters, such as bicarbonates, calcium, sulfur, sulfates, chlorides, radon, iron, magnesium, potassium, lithium, arsenic and silica, different therapeutic effects for musculoskeletal, respiratory, and skin diseases can be observed (Altman, 2000).

However, the recent pandemic caused by COVID-19 has imposed the need to investigate the potential transmission scenario of SARS-CoV-2 virus also in such atypical and poorly studied indoor environments, where an in-depth analysis of the aerosol concentrations and dimensional distributions are essential to monitor the spread of the virus. While some studies and models have been proposed to estimate the airborne risk of transmission in public environments such as hospitals (Chia et al., 2020; Guo et al., 2020; Liu et al., 2020) or restaurants (Buonanno et al., 2020a; Li et al., 2020), characterized by mild climatic conditions in terms of temperature and relative humidity, thermal environments have been poorly investigated; furthermore, the specific properties of these environments prevent their treatment and the application of conventional disinfection procedures in order to preserve their health benefits during balneotherapy or other treatments (Margarucci et al., 2019).

The main route of transmission of the SARS-CoV-2 virus to humans occurs predominantly via the respiratory route, by means of both small and large droplets (Morawska et al., 2020; WHO, 2020). The risk of transmission is dependent on different factors, such as droplet properties, indoor airflow, and virus characteristics. Droplet size influences both the deposition mechanisms and the extent of penetration in the human respiratory system. Small droplets (1 µm-5 µm) can remain suspended in the air for many hours and penetrate up to the alveoli, while larger droplets have a high sedimentation rate and deposit in the upper respiratory tract (Ghosh et al., 2015; Thomas et al., 2008). Moreover, being droplets constituted mostly of water associated with an aerosol-size nucleus, the evaporation kinetics, influenced by relative humidity and air temperature, affect their lifetime and deposition (Kohanski et al., 2020).

In addition to the chemical/physical characteristics of the aerosol particles, ventilation systems, and convection currents play a critical role in indoor environments: if appropriate, they can promote the removal of exhaled virus-laden air, thus lowering the airborne viral concentration; in case of inefficient or obstructed airflow, they can disperse the aerosol over a large area, with the potential to increase the risk of transmission to other occupants (Morawska et al., 2020).

The abiotic matter of the aerosol is generally associated with compounds of biological origin, including all pathogenic or nonpathogenic, live or dead fungi and bacteria, viruses, spores, pollens, and microbial secondary metabolites, which give origin to the so-called bioaerosol (Ghosh et al., 2015). Different studies concerning indoor air quality have found that between 5 and 34% of indoor air pollution is caused by biological compounds. The characterization of bioaerosol components is the subject of growing interest in the scientific community, especially for the effects that these components have on human health: infections, asthma, allergies, and other diseases of the respiratory tract (Srikanth et al., 2008).

The risks are influenced not only by the ability of the aerosol to penetrate the respiratory system, but also by its composition and biological activity. Bioaerosol composition is mainly dependent on the physical characteristics of the droplets or particles (e.g., size, density, and shape) and on environmental factors such as relative humidity, temperature, light intensity, moisture content of building material (Ghosh et al., 2015). Therefore, microbiological air quality is another important parameter to consider in a risk assessment plan.

For risk management in the initial phase of reopening of the thermal structures, some protocols and self-control plans have been developed but the development of new scientific evidence relating to this is desirable.

This research work was carried out inside a natural thermal cave located in Italy (Terme dei Papi, Viterbo) where a waterfall of sulfur–sulfate–bicarbonate–alkaline earth mineral thermal water creates a warm-humid environment with 100% humidity and 48 °C temperature. Characterization of the aerosol and bioaerosol was carried out to estimate personal exposure to aerosol concentrations in terms of number, surface area, air and mass, as well as particle size distributions, to evaluate the distribution inside the cave of these concentrations and to give an indication of the levels of the native microbial load. The final purpose was the identification of specific thresholds and alert values to support the development of a Risk Assessment Plan in thermal caves.

Materials and methods

Bioaerosol characterization

Bioaerosol active sampling

Air samples were collected by impaction with a singlestage air sampler Microflow α (AQUARIA srl, Italy), holding 380 jets with a diameter of 1 mm. The sampler was placed in a central position of the cave at 1 m height. The impaction flow rate was set at 120 L min⁻¹, and the airstream was directed on 90-mmdiameter agar Petri dishes containing different growth media, mainly Lysogeny Broth Agar (LBA) (10 g L^{-1} NaCl (Sigma-Aldrich, USA), 5 g L^{-1} yeast extract (Merck, Germany), 15 g L^{-1} agar (Difco, Michigan) and Plate Count Agar (PCA) (Difco, Michigan), or on cellulose nitrate filters with a pore size of 0.45 µm (Sartorius, Germany). Different sampling volumes, between 250 and 1000 L, were collected in duplicate. Filters were stored at -20 °C in sterile tubes until genomic DNA extraction.

Microbial load determination by cultivationdependent technique

Petri dishes resulting from the bioaerosol active sampling were incubated for 12 h at 25 °C and 50 °C, in order to estimate the mesophilic and thermophilic microbial load, respectively. The number of microbial colonies was expressed as colony-forming units per cubic meter (CFU m⁻³).

Quantitative PCR analysis for microbial load determination by cultivation-independent technique

Cellulose nitrate filters, deriving from bioaerosol active sampling, were used for total DNA extraction by using the DNeasy PowerWater kit (QIAGEN, Hilden, Germany) as described in the manufacturer's instructions.

Fungal and bacterial abundances were determined by q-PCR of 18S rRNA and 16S rRNA genes, respectively, on a LightCycler R 480 System (Roche Applied Science, USA). 18S rDNA sequences were amplified using the primer pair FR1F (5'-AICCATT-CAATCGGTAIT-3') and FF 390R (5-'CGATAACGAACGAGACCT-3'), while 16S rDNA sequences using the primer pair 331F (5'- TCCTACGGGAGGCAGCAGT-3') and 797R, (5'-GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT-3'). The protocol and optimized conditions described in Crognale et al. (2019) were applied. Melting curve analysis of the PCR products was performed to confirm that the fluorescence signals were derived from specific PCR products. Fungal and bacterial concentrations were calculated based on a standard curve obtained using triplicate tenfold serial dilutions $(10^2 - 10^{10} 18S \text{ or } 16S \text{ copy number})$ of known concentration of plasmid pGem T-easy cloning vector containing the target gene as the insert.

Bioaerosol passive sampling

Ninety-millimeter Petri dishes containing LBA or PCA medium were exposed to air for 2 h in a central position of the thermal cave, at 1 m height and subsequently incubated at 25 °C and 50 °C for 12 h. Counts of bacterial fungal colonies were expressed as colony-forming units per square meter per hour of exposure (CFU m⁻² h⁻¹).

Physical characterization of aerosol

The physical characteristics of the aerosol were measured using an optical spectrometer (OPS model 3330, TSI, Minnesota, USA). The OPS was calibrated by means of tests made in the European Accredited Laboratory of Industrial Measurements (LAMI) at the University of Cassino and Southern Lazio (Italy).

The samplings were repeated in two different days and in two distinct moments: at the morning before the first entrance to the cave and at the evening after the last entrance. Each measurement represented the average of several samplings lasting 100 s and was related to a number, surface area and mass concentration and size distributions of particles per unit volume of sampled air.

Starting from the size distributions of the aerosol measured in the cave and using appropriate deposition coefficients proposed by ICRP (1994), the lung-deposited fraction of inhaled particles was calculated. In particular, the ICRP data regard different deposition coefficients which allow evaluating the fraction of inhaled aerosol particles deposited in the alveolar and tracheobronchial regions of the respiratory apparatus for different physical activities, for women and men. The deposition coefficients provided by ICRP are

specific for each particle diameter and were "fitted" to the particle size distribution considered in this study (0.3 μ m–10 μ m) obtaining four specific deposition curves (alveolar and tracheobronchial for woman and man considered at resting).

SARS-CoV-2 transmission risk evaluation

To evaluate the airborne transmission risk of SARS-CoV-2 inside the cave, a model recently proposed by Buonanno et al., (2020a, b) was adopted. The model is able to quantify the probability of infection due to exposure in a microenvironment in presence of a SARS-CoV-2 infected subject, utilizing a four step approach: (i) evaluation of the quanta emission rate (quanta is defined as the dose of airborne droplet nuclei required to cause infection in 63% of susceptible persons (Buonanno et al., 2020a); (ii) evaluation of the exposure to quanta concentration in the microenvironment; (iii) evaluation of the dose of quanta received by an exposed susceptible subject; and (iv) estimation of the probability of infection on the basis of a dose-response model. These four steps are briefly described, referring to the original papers for more details (Buonanno et al., 2020a, b).

The quanta emission rate $(ER_q, quanta h^{-1})$ is evaluated as (first step):

$$ER_q = c_v \cdot c_i \cdot IR \cdot V_d = c_v \cdot \frac{1}{C_{RNA} \cdot C_{PFU}} \cdot IR \cdot V_d$$

where c_v (RNA copies mL⁻¹) is the viral load in the exhaled droplets, c_i (quanta RNA copies⁻¹) is a conversion factor, IR is the inhalation rate (m³ h⁻¹), and V_d is the exhaled droplet volume concentration (mL m⁻³), which depends on the respiratory activity.

The quanta concentration at time t to which a susceptible subject is exposed in an indoor environment is based on a mass balance and can be evaluated as (second step):

$$n(t, ER_q) = n_0 \cdot e^{-IVRR \cdot t} + \frac{ER_q \cdot I}{IVRR \cdot V} \cdot (1 - e^{-IVRR \cdot t})$$

where IVRR (h⁻¹) represents the infectious virus removal rate, n_0 represents the initial quanta concentration, I is the number of infectious subjects, V is the volume of the indoor environment, and ER_q is the quanta emission rate for the virus under investigation. IVRR depends on three mechanisms: air exchange rate

via ventilation, particle deposition on surfaces and viral inactivation. There are three important hypotheses on the quanta concentration calculation: the infectious virus removal rate is constant, the latent period of the disease is longer than the time scale of the model, and the droplets are instantaneously and evenly distributed in the indoor environment.

The dose of quanta received by an exposed susceptible subject to the quanta concentration, for a certain time interval (T), is evaluated as (third step):

$$D_q(ER_q) = IR \int_0^T n(t)dt$$

The probability of infection is calculated by an exponential dose–response model as (fourth step):

$$P_I = 1 - e^{-D_q}$$

Finally, the individual infection risk (R) of an exposed subject is calculated as the product of the probability of infection and the probability of occurrence of the specific ER_q value, while the basic reproduction number (R₀) is evaluated by multiplying the individual infection risk by the number of exposed susceptible individuals (Buonanno et al., 2020a).

Model parameters and hypothesized scenarios for the risk of infection transmission inside the cave

The parameters set as input data of the model, described in detail below, are: volume of the cave (V); total infectious viral removal rate (IVRR), which is the sum of the number of air exchanges per hour (AER), the deposition rate of particles on the surfaces (k) and rate of viral inactivation (λ), initial concentration of quanta (n₀), total time of occupation of the cave (t).

The volume of the cave was calculated directly from measurements carried out on-site and is equal to 34 m^3 , while the number of hourly changes of air was obtained from the technical specifications of the ventilation system installed ($260 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$) plus 0.2 h^{-1} to take into account the infiltrations deriving from the partial opening of the skylight, for a total of AER equal to 7.78 h^{-1} . The deposition rate of the particles (k) was set equal to 0.24 h^{-1} as proposed by Buonanno et al. (2020a) which calculated the

deposition rate as the ratio between the sedimentation rate of particles whose diameter is greater than 1 μ m (approximately 1.0×10^{-4} m s⁻¹ as measured by Chatoutsidou and Lazaridis (2019) and the height of the emission source (1.5 m). The viral inactivation rate (λ) was set equal to 0.63 h⁻¹ based on the value of the SARS-CoV-2 half-life (1.1 h) detected by van Doremalen et al. (2020) as follows:

$$\lambda(h^{-1}) = \frac{0.693}{t_{1/2}}$$

Finally, the initial quanta concentration (n_0) and the total occupation time of the cave (t) were set equal to zero and 8 h, respectively. All the parameters are shown in detail in Table 1.

As regards the hypothesized scenarios, these have been implemented by setting the following parameters: time of entry and exit from the cave and the emission rate of quanta of infectious subjects (ER_{q}) ; time of entry and exit from the cave and inhalation rate (IR) of the susceptible subject. In particular, we hypothesized four scenarios: the first (S1) involves the consecutive entry into the cave of two infectious subjects, for a residence time of 15 min for each, and subsequent entry into the cave of the susceptible subject, with a residence time of the latter equal to 15 min; the second (S2) involves the entry and stay of two infectious subjects and a susceptible subject simultaneously for 15 min. In the first scenario (S1), all the occupants were considered to be at rest (seated) and characterized only by respiratory activity, while in the second (S2), the occupants are considered to be standing and talking to each other. Both S1 and S2 scenarios have been implemented considering the ventilation system in operation and semi-opened skylight (AER = 7.78 h^{-1}). Starting for S1 and S2, two additional scenarios were considered: S3 (same of S1 without the ventilation system active) and S4 (same of S2 without the ventilation system active). For S3 and S4, however, an AER value of 0.2 h^{-1} was imposed to take into account infiltrations through the doors. Details of the simulated scenarios are reported in Table 2.

Results

Bioaerosol characterization inside the thermal cave

Microbiological sampling of the air is based on the capture of the corpuscular component of the aerosol, containing the biological fraction that is intended to be evaluated. The collection of airborne particles can be obtained through the use of passive sampling techniques, based on the inertial deposition of the microbiological fraction on a given surface, or through active sampling, based on the active aspiration of air with a controlled flow rate and volume of aspiration.

In Table 3, the cultivation-dependent microbial load values deriving from active and passive sampling techniques and the cultivation-independent microbial load estimated from active sampling are shown. The colonies collected in both active and passive samples were mostly bacterial (data not shown), although some rare fungal colonies were observed. Among bacteria, eight different morphotypes could be identified (Fig. S1) from both active and passive sampling, two of which presented a filamentous morphology, upon observation under an optical microscope, attributable to the group of Actinobacteria. Conversely, for fungi, the number of colonies isolated from both active and passive sampling was too low to be statistically representative, and although some morphotypes were identified, they were present only as a single colony. This result is also confirmed by molecular data where the value of 18S copy number m^{-3} , associated with fungal species, is two orders of magnitude lower than that of 16S, related to bacteria.

Values of microbial load deriving from passive sampling showed a predominance of thermophilic species, part of which was presumably able to grow even in mesophilic conditions. In active sampling,

Table 1 Summary of the input data used in the model for calculating the risk of infection inside the thermal cave

V (m ³)	AER (h ⁻¹)	k (h ⁻¹)	$\lambda (h^{-1})$	n_0 (quanta m ⁻³)	t (min)
34	7.78	0.24	0.63	0	480

Scenario	Infectious subject 1			Infectio	ous subject	2	Suscept	Susceptible subject			
	t _{in} (min)	t _{out} (min)	ER_q (quanta h^{-1})	t _{in} (min)	t _{out} (min)	ER_q (quanta h^{-1})	t _{in} (min)	t _{out} (min)	$IR (m^3 h^{-1})$	AER (h ⁻¹)	
S1	0	15	2.0	15	30	2.0	30	45	0.49	7.78	
S2	0	15	11.4	0	15	11.4	0	15	0.54	7.78	
S 3	0	15	2.0	15	30	2.0	30	45	0.49	0.2	
S4	0	15	11.4	0	15	11.4	0	15	0.54	0.2	

Table 2 Details of the exposure scenarios in the thermal cave implemented in the model (t_{in} time of entry into the cave, t_{out} time of exit from the cave, ER_q emission rate of quanta, IR inhalation rate, AER air exchange rate)

Table 3 Mean concentration of the cultivation-dependent mesophilic (25 °C) and thermophilic (50 °C) microbial load, deriving from active and passive sampling, and of cultivation-independent microbial load (n° gene copy m^{-3}) from active sampling

	25 °C	50 °C	
Cultivation-dependent techniques			
Active sampling CFU m ⁻³	36 ± 5^{a}	$28 \pm 4^{\mathrm{a}}$	
Passive sampling CFU m ⁻² h ⁻¹	3100 ± 300^{b}	4330 ± 240^{a}	
Cultivation-independent techniques			
16S copy number m^{-3}	_	-	$4.99E + 04 \pm 8.84E + 01$
18S copy number m^{-3}	-	-	$2.29E + 02 \pm 3.54E - 01$

Different letters in apex indicate statistical significance according to Tukey's test, between values of microbial load obtained at 25 and 50 °C of incubation

instead, the mesophilic and thermophilic microbial load values are comparable, probably due to a different fraction of collected microorganisms,

Physical characteristics of the aerosol inside the thermal cave

In this section, the results of the measurements made inside the thermal cave are reported. The data are shown as size distributions (Fig. 1) and average concentrations (Table 4) in terms of the number (N), surface area (SA), and mass (M) of particles. Since no significant changes in the aerosol characteristics were observed between the two days of measurements, and between morning and evening for each day, the data are shown as average values with the relative standard deviation among all the measurements carried out.

Starting from the size distributions of the aerosol measured in the cave and using appropriate deposition curves obtained from the ICRP data for the particle size range considered in this study $(0.3 - 10 \ \mu\text{m})$, it is possible to estimate the fraction of particles that

deposit within the respiratory system. The deposition curves are shown in Fig. 2, while a summary of the concentration in terms of the number, surface area, and mass of particles deposited in the respiratory system is reported in Table 5.

Risk of infection transmission inside the thermal cave

Based on the methodology described in "Materials and methods" section, the risk of SARS-CoV-2 transmission inside the cave is hereafter reported for the susceptible occupant (relative to his residence time) and for the susceptible persons (i.e., relative to the total time of occupation). The results of the simulations are reported in Table 6 as follows: (i) exposure time (t_{exp}) which is the occupation time in minutes for the susceptible subject and the total time of occupation for continuous occupation; (ii) individual infection risk (R) which represents the percentage probability of individual infection for the exposure to the quanta concentration profile integrated over the



Fig. 1 Particle size distributions of the aerosol measured inside the cave in terms of mass (M, in μ g m⁻³, solid line with circles), surface area (SA, in μ m² cm⁻³, dashed–dotted line with triangles) and number (N, in # cm⁻³, dotted line with diamonds) of particles per volume unit of sampled air, in the range 0.3 μ m–

 $10~\mu m$ in diameter, in 16 contiguous channels. Each dimensional channel value is reported as upper bound. The error bars represent the standard deviation in the measured data on each channel

Table 4 Average concentrations of the aerosol measured inside the cave in terms of number of particles per cm^3 of air (N), surface area of particles per cm^3 of air (SA), and mass of particles per m^3 of air (M)

	Average total concentration	Standard deviation
N (# cm ⁻³)	6.9×10^2	1.3×10^{2}
SA $(\mu m^2 cm^{-3})$	9.5×10^4	2.2×10^{4}
M ($\mu g m^{-3}$)	1.2×10^5	2.7×10^{4}

exposure time; (iii) exposure time for 1% and 0.1% risk ($t_{exp,1}$ and $t_{exp,0.1}$) which is the exposure time in minutes associated with a 1% and 0.1% probability of infection in order to consider different cohorts of individuals (younger–healthier individuals and weaker–older people, respectively); and (iv) maximum occupation of the cave for $R_0 < 1$ ($O_{max,R < 1}$) which represents the maximum number of occupants theoretically allowed in the cave for the exposure time and the quanta concentration profile of the designated scenario in order to keep the base reproduction number (R_0) below 1.

In Table 6, the symbol "greater than" means that the susceptible subject or the continuous occupation does not exceed the 0.1% or 1% risk threshold.

Figure 3 shows the variation over the whole simulation time of the model results for each scenario hypothesized: quanta concentration in the cave;

individual risk of infection for the susceptible subject; individual risk of infection for a subject who continuously occupies the cave for the entire simulated time; maximum theoretical occupancy of the cave to maintain $R_0 < 1$ (for a cohort that enters in the cave at the zero instant, continuous occupation).

Discussions

Bioaerosol characterization inside the thermal cave

As shown in Table 3, the active and passive sampling methods yield results that are not directly comparable, as they have different purposes: passive sampling is mainly used to measure the settling speed of particles on surfaces (CFU m⁻² h⁻¹), while active sampling is

b

10

d



Fig. 2 Deposition curves of particles, relative to the alveolar (ALV) and tracheobronchial (TB) regions of the respiratory system specific for adult women and men at rest (seated) who

Table 5 Particle concentration in terms of number (N), surface area (SA), and mass (M) of particles deposited in the two regions of the respiratory system per unit of volume of inhaled

breathe mainly through the nose, a typical situation of the people who occupy the thermal cave

6

μm

8

10

5

μm

4

air inside the cave (adults at rest, male—female, ALV = alveolar region, TB = tracheobronchial region)

	Male			Female			
	ALV	TB	Total male	ALV	TB	Total female	
N ($\#$ cm ⁻³)	68.02	25.84	93.86	59.46	28.37	87.83	
SA ($\mu m^2 \ cm^{-3}$)	6.37×10^{3}	3.12×10^{3}	9.49×10^{3}	5.90×10^{3}	3.37×10^{3}	9.27×10^{3}	
$M~(\mu g~m^{-3})$	7.85×10^{3}	4.00×10^{3}	1.18×10^{4}	7.30×10^{3}	4.29×10^{3}	1.16×10^{4}	

Table 6 Simulation results for all the hypothesized scenarios referred to both the conditions of individual risk (susceptible subject) and continuous occupation of the thermal cave (t_{exp} : exposition time; R: individual infection risk; $t_{exp,0.1}$: exposure

time for 0.1% risk; $t_{exp,1}$: exposure time for 1% risk; $O_{max,RO<1}$: maximum occupation of the cave for $R_0 < 1$, AER: air exchange ratio)

	Suscept	Susceptible subject					Continuous occupation				
Scenario	t _{exp} (min)	R (%)	t _{exp,0.1} (min)	t _{exp,1} (min)	O _{max,R0<1}	t _{exp} (min)	R (%)	t _{exp,0.1} (min)	t _{exp,1} (min)	O _{max,R0<1}	AER (h ⁻¹)
S1	15	0.01	> 15	> 15	2742	480	0.02	> 480	> 480	605	7.78
S2	15	0.1	> 15	> 15	156	480	0.15	15	> 480	96	7.78
S 3	15	0.04	> 15	> 15	386	480	0.20	54	> 480	75	0.2
S4	15	0.16	11	> 15	91	480	1.21	11	103	12	0.2



Fig. 3 Simulation results time course: scenario 1 (S1, ventilation system in operation, (**a**); scenario 2 (S2, ventilation system not in operation, (**b**); scenario 3 (S3, ventilation system in operation, (**c**) and scenario 4 (S4, ventilation system not in

used to measure the average concentration of airborne microorganisms (CFU m⁻³) (Cabral, 2010). Nowadays, there are no worldwide accepted regulations for microbial exposure assessment in different environments except for those elaborated for the control of the working environment summarized in four European standards: EN 13098:2000, EN 14031:2003, EN 14042:2003, and EN 14583:2004. However, these standards refer only to the methodology to be followed but do not specify threshold values for the microbial load. The only reference to evaluate the contamination levels is a document from the European Collaborative Action (EUR 14988) reporting the indicative levels of microbial air contamination by means of active sampling, the exceeding of which does not automatically imply the establishment of dangerous or unhealthy conditions.

Referring to these guidelines, a microbial load < 100 CFU m⁻³, like that observed in the thermal cave under investigation, is considered a very low level of contamination. Given the particular conditions



operation, (d). Quanta concentration (solid lines); continuous risk (dotted lines); individual infection risk (dashed lines) and maximum occupancy (dashed–dotted lines)

of the thermal environment, in addition to the reference incubation temperature for mesophilic microorganisms of 25 °C, the plates were also incubated at 50 °C to evaluate also the thermophilic microbial fraction. Even in the latter case, the microbial load values were fully within a very low level of contamination.

Regarding the passive sampling technique, although it provides an idea of the number of biological agents that undergo sedimentation per hour, it is not possible to establish any thresholds since it is not a quantitative method, it does not allow to correlate the number of microorganisms at a known volume of air and has a very low sensitivity. However, it can be considered as a qualitative parameter to describe the fate of particles in bioaerosol. In this study, the passive sampling could collect a high number of microorganisms probably because the bioaerosol was mainly composed of large-size particles (≥ 10 um) characterized by a high sedimentation rate (Cabral, 2010). In addition to culture-dependent traditional microbiological methods, further quantification of the airborne microbial concentration was performed in this study by quantitative PCR. In fact, culture-dependent methods can only detect the viable and culturable microbial agents, leaving out a significant portion of particulates of microbial origin including viable but nonculturable and dead microorganisms; furthermore, the majority of airborne particles of microbial origin, even when viable, are nonculturable and unable to form new colonies even with appropriate media (Górny, 2020).

As expected, the amount of microbial load detected by molecular techniques was significantly higher compared to that found with methods culture-dependent, equal to one order of magnitude higher for fungi and three orders for bacteria.

Therefore, by combining molecular techniques with traditional and recognized microbiological techniques, it is possible to have a more complete picture of the microbial community present in the bioaerosol.

Physical characteristics of the aerosol inside the thermal cave

From the analysis of data relating to the physical characteristics of the aerosol measured inside the thermal cave, it can be seen that the dimensional distribution in terms of the number of particles results trimodal, with the first mode located around 0.3 μ m, a second one around 3 μ m and the last one around 8 μ m, as shown in Fig. 1. It should be noted, anyway, that the two modes that mainly characterize the size distribution in terms of the number are the first one $(0.3 \ \mu m)$ and the last one (8 μ m), while the mode at 3 μ m results less pronounced. The size distributions in terms of surface area and mass of particles, on the contrary, resulted unimodal with the mode at 10 µm (Fig. 1). From the analysis of the data, it can be stated that the dimensional distribution in number highlights the presence in the cave of a significant fraction of particles whose dimensions were below the detection threshold of the spectrometer (sub-micrometric particles) even if the fraction of particles with the mode around 8 µm were predominant. On the other hand, both the distributions in terms of surface area and mass of particles were characterized with a mode totally shifted to higher particle diameters. Summarizing, the analysis of the measured data indicated the presence in the cave of a significant fraction of sub-micrometric particles and a predominant fraction of super-micrometric particles contributing to the surface area and mass concentration. These super-micrometric particles consisted, presumably, of water droplets, while the sub-micrometric particles may consist of the solid nuclei, resulting from the evaporation of the volatile fraction, which remain suspended in the air.

Risk of infection transmission inside the thermal cave

The analysis of the data reported in Table 6 allowed to characterize the cave in terms of risk of infection under the assumptions of the model and for the considered scenarios. First of all, considering the reported data, it should be highlighted the determining effect of the mechanical ventilation system on the risk of contagion: for all the hypothesized scenarios, there is a substantial reduction in the risk of contagion considering the ventilation system active (both for the individual susceptible subject in the 15 min. of stay and for continuous occupation of the cave). This effect is made even more evident by the parameter relating to the maximum occupation of the cave (continuous occupation) which changes from the theoretical value of 75 to that of 605 (with ventilation system deactivated, S3, and activated, S1, respectively), and from 12 to 96 (with ventilation system deactivated, S4, and activated, S2, respectively). However, the purely theoretical role, albeit significant, of this parameter should be highlighted: in fact, the simultaneous presence of more occupants than the surface of an indoor environment would allow is unlikely.

Furthermore, from the analysis of the results, it is evident that the adoption of social distancing measures such as nonsimultaneous access to the cave (S1) makes the risk of contagion extremely low, according to the assumptions of the model, even with the mechanical ventilation system not active. A condition that presents a relatively high risk for the single susceptible subject is that relating to the modeled scenario with the ventilation system not active and the presence of two infectious subjects and one susceptible subject at the same time in the cave talking to each other (S4). In this case, in fact, assuming a probability of infection of 0.1%, the maximum exposure time is less than the 15-min of residence time for the susceptible subject (11 min). On the contrary, for scenario 1 with the ventilation system not active (S3), the maximum exposure time is less than the maximum time (54 min out of 480), highlighting, once again, the fundamental role of the mechanical ventilation system. Finally, from the analysis of Fig. 3, it can be seen that the mechanical ventilation system active results in a sudden reduction in the quanta concentration in the cave (solid lines in Fig. 3) that reaches a zero value after about 75 min for both S1 and S3 scenarios and in a consequent reduction of the risk of contagion (both individual risk, dashed lines, and continuous risk, dotted lines) and increase in maximum occupancy (dashed-dotted lines). On the contrary, with the ventilation system not active, the quanta concentration reaches zero value after about 460 min for scenario 2, while for the worst hypothesized scenario (S4), the quanta concentration still remains greater than zero after the whole simulation period (480 min).

The authors want to highlight the main limitation of the model which lies in the "box model" approach, according to which the air is perfectly mixed in the cave and, consequently, the quanta concentration over time becomes uniform in space. According to this approach, susceptible individuals are therefore exposed to the same quanta concentration regardless of their position in the cave. Differences in exposure risk between susceptible occupants are therefore reduced to a function of the duration of exposure rather than their position in the cave. In light of these simplifying hypotheses, the accuracy of the model depends on the spatial scale analyzed. In general, the smaller the enclosed space, the more the air is mixed, and therefore the closer the results are to reality.

Conclusions

The microbiological characterization of the bioaerosol inside the thermal cave highlighted a low microbial load, with a prevalence of noncultivable strains generated by the aerosolization of the thermal waters. Although there are no worldwide accepted regulations for microbial air contamination, by comparing the data deriving from culture-dependent techniques with the indicative levels established by the European Collaborative Action (EUR 14988), the detected microbial load values can be classified as a very low level of contamination, therefore associated with good air quality. The physical characterization of the aerosol revealed a trimodal dimensional distribution in terms of the number of particles, with the first mode located around 0.3 μ m, a second one around 3 μ m and the last one around 8 μ m. The size distributions in terms of surface area and mass of particles, on the contrary, resulted unimodal with the mode at 10 μ m. The analysis of the measured data indicated the presence in the cave of a significant fraction of sub-micrometric particles, whose main contribution lies in the number concentration, and a predominant fraction of supermicrometric particles contributing to the surface area and mass concentration. These super-micrometric particles consisted, presumably, of water droplets, while the sub-micrometric particles may consist of the solid nuclei, resulting from the evaporation of the volatile fraction, which remain suspended in the air.

In terms of the risk of SARS-CoV-2 infection, evaluated under the hypotheses of the model, the decisive effect of the mechanical ventilation system on the risk of contagion is highlighted: for all the hypothesized scenarios, there is a substantial reduction in the risk of contagion considering the ventilation system active. Furthermore, the adoption of social distancing measures such as nonsimultaneous access to the cave makes the risk of contagion extremely low, according to the assumptions underlying the model, even with the mechanical ventilation system not active.

Acknowledgements This work has been carried out within the framework of COVID-19 activities of I-SUM/CINTEST group and has received funding from both University of Tuscia, Viterbo (Italy), under "Action for research activities related to COVID-19 emergency" Rector note n°5445, 05-05-2020 and Terme de Papi (Viterbo, Italy) within the study "Characterization of Bioaerosol in the Thermal Cave of Terme dei Papi and effect of environmental conditions in the decay and transmission of biological agents."

Authors' Contributions MS was involved in the collection, interpretation, and statistical analysis of physical data, and in the application of the mathematical model; SC helped supervise the project, conceived the experimental design, and performed the statistical analysis and interpretation of biological data. DL collected the biological samples and performed the biological experiments. EC wrote the manuscript and helped with the collection of biological samples and with the interpretation of biological results. GC secured funding for the study and supervised the project. All authors discussed the results and contributed to the final manuscript and revision.

Data availability and material Data, models, or code generated or used during the study, which are not reported in the manuscript, are available from the corresponding author by request.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors have no conflict of interest to declare that are relevant to the content of this article.

Consent to participate Consent to participate is not applicable. This article does not contain any studies involving human participants.

Consent to publish Consent to publish is not applicable. This article does not contain any studies involving human participants.

Ethical approval This article does not contain any studies involving animals or human participants performed by any of the authors. No ethical approval is required.

References

- Altman, N. (2000). *Healing springs: The ultimate guide to taking the waters*. Inner Traditions/Bear & Co.
- Buonanno, G., Morawska, L., & Stabile, L. (2020a). Quantitative assessment of the risk of airborne transmission of SARS-CoV-2 infection: Prospective and retrospective applications. *Environment International*, 145, 106112.
- Buonanno, G., Stabile, L., & Morawska, L. (2020b). Estimation of airborne viral emission: Quanta emission rate of SARS-CoV-2 for infection risk assessment. *Environment International*, 141, 105794.
- Cabral, J. P. (2010). Can we use indoor fungi as bioindicators of indoor air quality? Historical perspectives and open questions. Science of the total environment, 408(20), 4285–4295.
- Chatoutsidou, S. E., & Lazaridis, M. (2019). Assessment of the Impact of Particulate Dry Deposition on Soiling of Indoor Cultural Heritage Objects Found in Churches and Museums/Libraries. *Journal of Cultural Heritage*, 39, 221–228.
- Chia, P. Y., Coleman, K. K., Tan, Y. K., Ong, S. W. X., Gum, M., Lau, S. K., & Son, T. T. (2020). Detection of air and surface contamination by SARS-CoV-2 in hospital rooms of infected patients. *Nature Communications*, 11(1), 1–7.
- Crognale, S., Stazi, S. R., Firrincieli, A., Pesciaroli, L., Fedi, S., Petruccioli, M., & D'Annibale, A. (2019). Time-dependent changes in morphostructural properties and relative abundances of contributors in *Pleurotus ostreatus/Pseudomonas alcaliphila* mixed Biofilms. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1819.
- European Collaborative Action Indoor Air Quality and its Impact on Man (formerly Cost Project 613) - Environment and Quality of Life. EUR 14988.
- Ghosh, B., Lal, H., & Srivastava, A. (2015). Review of bioaerosols in indoor environment with special reference to sampling, analysis and control mechanisms. *Environment international*, 85, 254–272.
- Górny, R. L. (2020). Microbial aerosols: Sources, properties, health effects, exposure assessment—a review. KONA Powder and Particle Journal, 37, 64–84.

- Guo, Z. D., Wang, Z. Y., Zhang, S. F., Li, X., Li, L., Li, C., & Zhang, M. Y. (2020). Aerosol and surface distribution of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 in hospital wards, Wuhan, China, 2020. *Emerging Infectious Diseases*, 26(7), 1583–1591.
- International Commission on Radiological Protection. (1994). Human respiratory tract model for radiological protection A report of a Task Group of the International Commission on Radiological Protection. *Annals of the ICRP*, 24, 1–482.
- Kohanski, M. A., Lo, L. J., & Waring, M. S. (2020). Review of indoor aerosol generation, transport, and control in the context of COVID-19. *International Forum of Allergy and Rhinology*, 10, 1173–1179.
- Li, Y., Qian, H., Hang, J., Chen, X., Hong, L., Liang, P., & Kang, M. (2020). Evidence for probable aerosol transmission of SARS-CoV-2 in a poorly ventilated restaurant. *medRxiv*. https://doi.org/10.1101/2020.04.16.20067728
- Liu, Y., Ning, Z., Chen, Y., Guo, M., Liu, Y., Gali, N. K., et al. (2020). Aerodynamic characteristics and RNA concentration of SARS-CoV-2 aerosol in Wuhan hospitals during COVID-19 outbreak. *BioRxiv.* https://doi.org/10.1101/ 2020.03.08.982637
- Margarucci, L. M., Romano Spica, V., Gianfranceschi, G., & Valeriani, F. (2019). Untouchability of natural spa waters: Perspectives for treatments within a personalized water safety plan. *Environment International*, 133, 105095.
- Morawska, L., Tang, J. W., Bahnfleth, W., Bluyssen, P. M., Boerstra, A., Buonanno, G., & Haworth, C. (2020). How can airborne transmission of COVID-19 indoors be minimised? *Environment international*, 142, 105832.
- Srikanth, P., Sudharsanam, S., & Steinberg, R. (2008). Bio-aerosols in indoor environment: Composition, health effects and analysis. *Indian journal of medical microbiology*, 26(4), 302.
- Thomas, R. J., Webber, D., Sellors, W., Collinge, A., Frost, A., Stagg, A. J., et al. (2008). Characterization and deposition of respirable large-and small-particle bioaerosols. *Applied* and environmental microbiology, 74(20), 6437–6443.
- Van Doremalen, N., Bushmaker, T., Morris, D. H., Holbrook, M. G., Gamble, A., Williamson, B. N., et al. (2020). Aerosol and surface stability of SARSCoV-2 as compared with SARS-CoV-1. *The New England Journal of Medicine*, 382, 1564–1567.
- EN 13098:2000. (2000). Workplace Atmosphere Guidelines for Measurement of Airborne Micro-organisms and Endotoxin.
- EN 14031:2003. (2003). Workplace atmosphere-Determination of airborne endotoxins.
- EN 14042: 2003. (2003). Workplace Atmospheres–Guide for the Application and Use of Procedures for the Assessment of Exposure to Chemical and Biological Agents.
- EN 14583:2004. (2004). Workplace atmospheres—volumetric bioaerosol sampling devices— requirements and test methods.
- World Health Organization (2020) Transmission of SARS-CoV-2: implications for infection prevention precautions: scientific brief, 09 July 2020 (No. WHO/2019-nCoV/Sci_Brief/ Trasmission_modes/2020.3). World Health Organization

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.