



Articolo

Un Approccio Combinato Sostenibile per il Controllo della Carica Microbica nell'Ambiente Scolastico

Maria D'Accolti ^{1,2,*}, Irene Soffritti ^{1,2,†}, Eleonora Mazziga ^{1,2}, Francesca Bini ^{1,2}, Matteo Bisi ², Antonella Volta ², Sante Mazzacane ² e Elisabetta Caselli ^{1,2,*}

¹ Sezione di Microbiologia, Dipartimento di Scienze dell'Ambiente e della prevenzione, Università di Ferrara, 44121 Ferrara, Italia

² Centro di Ricerche CIAS, Università di Ferrara, 44121 Ferrara, Italia

* Autori a cui indirizzare la corrispondenza.

† Questi autori hanno contribuito in egual misura al lavoro.

Riassunto

Il microbioma degli ambienti confinati "indoor" è un ecosistema dinamico che include patogeni in grado di influenzare la salute umana. In questo contesto, l'ambiente scolastico rappresenta il principale spazio abitativo degli esseri umani per molti anni, e un ambiente malsano può condizionare in modo significativo la salute degli studenti. Le aule scolastiche possono soffrire di ventilazione insufficiente e dell'impiego di materiali da costruzione che possono favorire la contaminazione da parte di patogeni, sanificati prevalentemente mediante metodi convenzionali a base chimica, i quali possono aumentare l'inquinamento, avere effetti temporanei e indurre la selezione di resistenza antimicrobica (AMR) nei microbi persistenti. Allo scopo di ricercare metodi sostenibili ed efficaci per migliorare la salubrità dell'ambiente scolastico, è stato condotto uno studio caso-controllo pre-post in una scuola superiore italiana. Nell'arco di un anno, diversi interventi, tra i quali l'introduzione di piante, un sistema di ventilazione meccanica e la sanificazione a base di probiotici (PBS), in sostituzione della sanificazione chimica, sono stati implementati e valutati per il loro impatto sulla carica microbica (bioburden) e sulla qualità dell'aria. Attraverso il monitoraggio microbico continuo delle aule selezionate, mediante metodi coltura-dipendenti e indipendenti, è stata rilevato un notevole livello di carica microbica al basale (circa 12.000 e 20.000 CFU/m², rispettivamente prima e dopo le lezioni), composto principalmente da *Staphylococcus* spp. e funghi. È stata osservata una lieve riduzione della contaminazione fungina dopo l'introduzione delle piante. Tuttavia, la riduzione più significativa dei patogeni e della relativa AMR è stata osservata dopo l'introduzione del sistema di ventilazione e della PBS, con una diminuzione dei patogeni superiore all'80% ($p < 0.001$) e dell'AMR fino a 3 Log₁₀ ($p < 0.001$) rispetto ai controlli. I dati raccolti supportano l'uso di strategie combinate per migliorare la qualità microbica degli ambienti interni e confermano che la PBS può controllare efficacemente la carica microbica e la diffusione dell'AMR, non solo negli ambienti sanitari.

Parole chiave: ambiente scolastico; carica microbica patogena; sanificazione a base di probiotici; interventi ecologici

Editor Accademici: Carla Viegas and Ana C. Sampaio

Ricevuto: 30 Gennaio 2025

Revisionato: 12 Marzo 2025

Accettato: 26 Marzo 2025

Pubblicato: 30 Marzo 2025

Citazione: D'Accolti, M.; Soffritti, I.; Mazziga, E.; Bini, F.; Bisi, M.; Volta, A.; Mazzacane, S.; Caselli, E. A Sustainable Combined Approach to Control the Microbial Bioburden in the School Environment. *Microorganisms* **2025**, *13*, 791.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms13040791>

Copyright: © 2025 by the authors.

Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license

(<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduzione

Il microbioma ambientale è un fattore chiave per la salute umana all'interno degli ambienti costruiti (Built Environments, BEs) [1–3]. I BEs sono sistemi organici complessi

a causa delle numerose comunità microbiche interdipendenti che ospitano, le quali hanno un impatto significativo sulla salute umana e possono potenzialmente minacciarne il benessere [4]. Le istituzioni educative, come le scuole, rappresentano ambienti primari durante le fasi educative della vita umana, poiché gli studenti vi trascorrono generalmente un terzo della loro giornata. Caratterizzare il microbioma in questi ambienti è fondamentale per comprendere come questo possa influenzare la salute [5], il benessere e il rendimento quotidiano degli studenti.

Il microbioma scolastico interno può essere influenzato da diversi fattori, tra cui le caratteristiche degli occupanti (sesso, fasce d'età) e le loro attività [6,7], le modalità di ventilazione [8], i materiali da costruzione [9], gli inquinanti atmosferici [5] e le pratiche di igiene ambientale [10]. È dimostrato che la qualità dell'aria interna (IAQ) e la ventilazione negli edifici scolastici svolgono un ruolo cruciale nella diffusione della contaminazione da aerosol batterici e fungini, con conseguente aumento del rischio di sviluppare la "sindrome dell'edificio malato" (Sick Building Syndrome, SBS), caratterizzata da irritazioni delle mucose e della pelle, affaticamento mentale, nausea e problemi respiratori, inclusi asma e rinite [2,11–13].

Nelle scuole europee, i vecchi edifici ventilati naturalmente spesso presentano una ventilazione inadeguata, e il flusso d'aria insufficiente può portare a una scarsa qualità dell'aria, livelli elevati di CO₂ e un peggioramento dei problemi di salute associati all'esposizione a microbi patogeni indoor [14,15]. La ventilazione meccanica controllata può generalmente migliorare la qualità dell'aria indoor, come dimostrato dal monitoraggio di CO₂ e altri inquinanti [8,16], ma il suo impatto sul microbioma ambientale interno rimane poco chiaro. Inoltre, anche i materiali edilizi e il design architettonico possono influenzare il microbioma dei BEs, incluse le scuole [9]. I materiali che trattengono l'umidità, come la carta e i tessuti, possono effettivamente favorire la crescita microbica, in particolare quella di funghi patogeni in grado di scatenare reazioni allergiche o malattie respiratorie, inclusa la già menzionata SBS [17,18].

Per promuovere un ambiente scolastico più sano, il concetto di "naturalizzazione" — ovvero l'introduzione di piante e la creazione di spazi "verdi" — ha recentemente suscitato interesse, poiché gli elementi naturali sono stati associati a numerosi benefici per gli studenti, tra cui miglioramenti della salute fisica e mentale [19]. Le piante da interno possono agire come fonte di dispersione microbica negli ambienti chiusi [20], includendo microrganismi benefici che possono influenzare positivamente la salute degli studenti [21]. Ad esempio, *Epipremnum aureum* (Golden pothos), una pianta d'appartamento molto popolare e comunemente usata a scopo ornamentale, ha dimostrato offrire benefici per la salute negli ambienti scolastici, come il miglioramento dell'umidità dell'aria, della temperatura e dei livelli di CO₂, anche se non è stato evidenziato un impatto significativo sulle muffe aerodisperse [22].

La sanificazione delle superfici è un altro fattore cruciale per mantenere sano l'ambiente scolastico ed evitare la diffusione di patogeni [23]. Le superfici ad alto contatto (come banchi, pavimenti e maniglie delle porte) possono fungere da serbatoi di microbi potenzialmente pericolosi, tra cui *Staphylococcus* spp., in grado di causare un'ampia gamma di infezioni, da lievi condizioni cutanee a malattie gravi e potenzialmente letali [24–26]. La pulizia e disinfezione quotidiana delle aule e degli spazi comuni può contribuire a ridurre la diffusione di patogeni e delle malattie ad essi associate [23]. Tuttavia, i metodi di sanificazione convenzionali spesso prevedono l'uso di disinfettanti chimici aggressivi che, sebbene efficaci nel breve termine, hanno effetti limitati nel lungo periodo e contribuiscono all'inquinamento [27,28]. Inoltre, i disinfettanti chimici eliminano anche i microbi benefici, importanti per mantenere un'elevata biodiversità e l'eubiosi degli ambienti indoor [29].

Recentemente, sistemi di sanificazione innovativi, basati sull'uso di detergenti ecologici contenenti probiotici sicuri del genere *Bacillus*, si sono dimostrati altamente efficaci nel controllo della carica microbica in ambienti sanitari, prevenendo al contempo l'aumento della resistenza antimicrobica (AMR) e dell'inquinamento [30–33]. Un sistema denominato PCHS (Probiotic Cleaning Hygiene System), che include le specie *Bacillus subtilis*, *Bacillus velezensis* (ex *pumilus*) e *Priestia megaterium* (ex *B. megaterium*), ha dimostrato di ridurre stabilmente i patogeni e le infezioni ospedaliere [34,35] attraverso una modulazione stabile del microbioma indoor e dell'AMR associata [34–43].

Sulla base delle osservazioni e dei dati sperimentali riportati, il presente studio ha l'obiettivo di indagare l'impatto di applicazioni sostenibili integrate, tra cui l'introduzione di piante, la ventilazione e la sanificazione PCHS, sul microbioma indoor in una scuola italiana, con lo scopo di creare un ambiente più sano per studenti e insegnanti.

2. Materiali e Metodi

2.1. Disegno dello studio

Uno studio caso-controllo pre–post è stato condotto presso il Liceo “Ludovico Ariosto” di Ferrara, Italia, da luglio 2023 a maggio 2024. Lo studio ha rappresentato una parte di un progetto di Percorsi per le Competenze Trasversali e l'Orientamento (PCTO), approvato dal dirigente scolastico. Sono state coinvolte nello studio due aule con una superficie di 48,7 m² e caratteristiche sovrapponibili; una di esse è stata sottoposta a interventi sperimentali (aula test, TR), mentre l'altra non ha ricevuto alcun intervento ed è servita da controllo (aula di controllo, CR). Le principali caratteristiche delle aule sono riassunte nella Tabella 1.

Entrambe erano dotate di ampie finestre rivolte verso l'esterno, che fornivano luce naturale e ventilazione. Ulteriori finestre erano collocate sul soffitto a un'altezza di 5,15 metri, e altre finestre affacciate sul corridoio principale erano posizionate sul lato opposto rispetto a quelle esterne, garantendo così un flusso d'aria orizzontale nella stanza. L'aula era inoltre dotata di 17 banchi per studenti e una cattedra per l'insegnante.

Tabella 1. Principali caratteristiche delle classi arruolate.

| Caratteristiche | Misure |
|--------------------|---------------------|
| Lunghezza | 8.47 m |
| Profondità | 5.75 m |
| Altezza soffitto | 3.23 m |
| Altezza massima | 5.15 m |
| Area del pavimento | 48.7 m ² |
| Volume | 170 m ³ |

Lo studio ha incluso quattro fasi successive: fase T0 (5 mesi, luglio 2023 - novembre 2023), durante la quale sono state applicate la consueta sanificazione convenzionale a base chimica, tramite prodotti a base alcolica, e la ventilazione naturale tramite apertura delle finestre; fase T1 (1 mese, dicembre 2023), durante la quale specifiche piante sono state collocate nella TR, mantenendo i sistemi di sanificazione e ventilazione convenzionali; fase T2 (1 mese, gennaio 2024), durante la quale un sistema di ventilazione meccanica dell'aria è stato aggiunto alla TR, insieme alle piante e mantenendo la sanificazione convenzionale; e fase T3 (4 mesi, febbraio 2024 - maggio 2024), durante la quale la TR ha ricevuto una sanificazione a base di probiotici in sostituzione di quella convenzionale a base chimica, in aggiunta alle piante e alla ventilazione meccanica. L'aula CR non ha ricevuto alcun intervento ed è stata monitorata come controllo durante l'intero periodo dello studio.

2.2. Interventi “Green”: Piante, Ventilazione e Sanificazione a Base di Probiotici

Tre interventi successivi sono stati implementati nella TR per migliorare la qualità dell’ambiente indoor: collocazione di piante verdi (T1), installazione di un sistema di ventilazione meccanica (T2) e implementazione di una sanificazione a base di probiotici in sostituzione di quella convenzionale a base chimica (T3).

Le specie vegetali collocate nella TR durante il periodo T1 sono state *Golden pothos* e *Tillandsia kammii* Rauh. Sono state scelte per la loro resistenza, l’idoneità al verde verticale e la facilità di gestione. Gli studenti potevano prendersene cura ed eventualmente propagarle come parte del progetto PCTO. Tutte le piante, che sono rimaste nella TR fino al termine dello studio, sono state fornite dall’Orto Botanico dell’Università di Ferrara.

Il sistema di ventilazione meccanica installato nella TR durante il periodo T2 era il modello a sviluppo verticale VEX 380S (Aldes, Modena, Italia), con una portata massima d’aria di 1000 m³/h e dotato anche di una unità fan coil per il riscaldamento.

La procedura di pulizia a base di probiotici, implementata nella TR durante il periodo T3, consisteva nel Probiotic Cleaning Hygiene System (PCHS, Copma, Italia) [34,36,39], basato su un detergente ecologico contenente 10⁷/mL spore di tre specie di probiotici del genere *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. velezensis* ex *B. pumilus* e *Priestia megaterium* ex *B. megaterium*). Essa ha sostituito la sanificazione quotidiana effettuata con prodotti a base alcolica. Sia la sanificazione convenzionale che quella con PCHS sono state eseguite quotidianamente al termine delle lezioni mattutine da operatori scolastici adeguatamente formati, secondo procedure standard [39].

Il disegno e la tempistica dello studio sono riassunti schematicamente nella Figura 1.

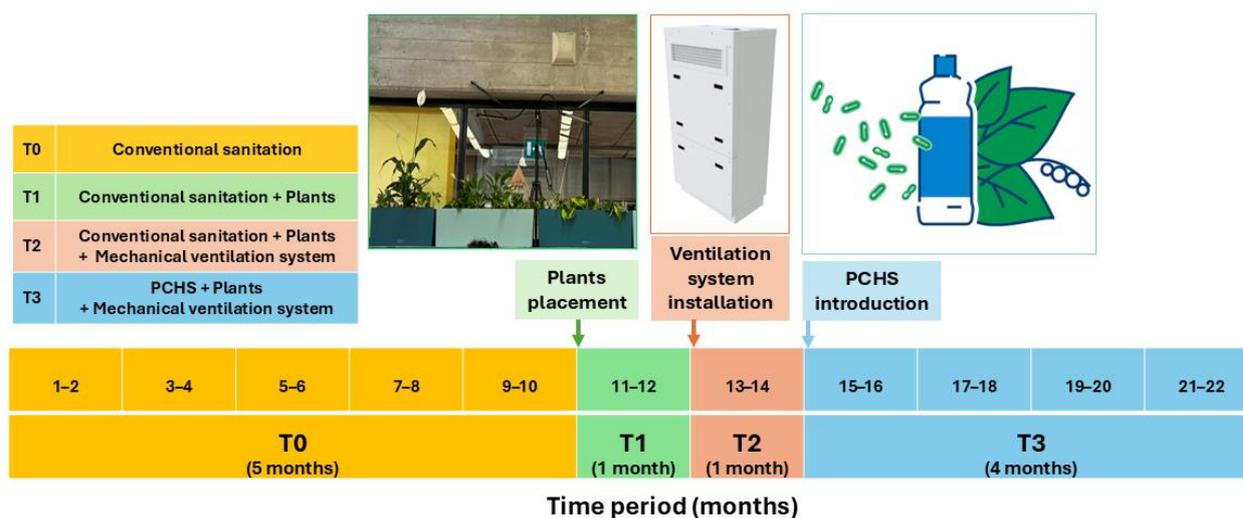


Figura 1. Disegno dello studio. Lo studio ha coinvolto due aule (aula test, TR; e aula di controllo, CR) ed è consistito in quattro fasi successive: T0 (giallo), un periodo di 5 mesi con sanificazione convenzionale e ventilazione naturale; T1 (verde), un periodo di 1 mese durante il quale sono state collocate piante nella TR; T2 (rosa), un periodo di 1 mese durante il quale è stata introdotta la ventilazione meccanica nella TR; e T3 (azzurro chiaro), un periodo di 4 mesi durante il quale è stato implementato il sistema PCHS nella TR. La CR non ha ricevuto alcun intervento ed è servita da controllo. I campionamenti sono stati effettuati con cadenza bimestrale nella TR e nella CR, e il numero è indicato all’interno del riquadro relativo al periodo.

2.3. Monitoraggio ambientale

L'ambiente delle aule è stato monitorato in continuo durante l'intero studio. I parametri ambientali valutati includevano temperatura (°C), umidità relativa (UR) e CO₂. Le misurazioni sono state effettuate utilizzando i Data Logger Wi-Fi Testo 160 IAQ (Testo S.p.A, Milano, Italia), che forniscono la misurazione continua dei parametri indicati tramite due sensori posizionati nelle aule coinvolte nello studio.

Il monitoraggio microbiologico è stato effettuato con cadenza bimestrale durante ciascuna fase, per un totale di 22 campagne di campionamento nell'intero periodo di studio, di cui 10 durante la fase T0, 2 durante T1, 2 durante T2 e 8 durante T3. In ciascuna campagna di campionamento, i campioni da superfici e aria sono stati raccolti sia prima che dopo le lezioni degli studenti, al fine di valutare l'impatto della loro presenza sulla contaminazione microbica. I campioni di superficie includevano il pavimento, la cattedra e due banchi degli studenti (Figura 2). Tutti i punti delle superfici selezionate sono stati campionati simultaneamente con due metodi differenti, a seconda del tipo successivo di analisi.

Per le analisi microbiologiche, i campioni sono stati raccolti in duplicato utilizzando piastre a contatto RODAC di 55 mm di diametro (corrispondenti a una superficie di 24 cm²) contenenti i seguenti terreni di coltura generali e specifici: Plate Count Agar (PCA, Biolife, Monza, Italia) per la conta batterica totale, Baird Parker Agar (BP, Sharlab, Milano, Italia) per *Staphylococcus* e *Bacillus* spp., Mac Conkey Agar (MCA, Sharlab, Milano, Italia) per *Enterobacteriaceae*, Cetrimide Agar (CA, Sharlab, Milano, Italia) per *Pseudomonas* spp. e Dichloran Glycerol Agar (DG18, Sharlab, Milano, Italia) per i funghi totali, inclusi *Candida* e *Aspergillus* spp.. Il campionamento dell'aria è stato effettuato al centro della stanza mediante lo strumento Surface Air System (SAS) (VWR International, Milano, Italia), raccogliendo 1 m³ d'aria sugli stessi terreni utilizzati per il campionamento delle superfici.

Per le analisi molecolari, campioni in duplicato sono stati raccolti dagli stessi punti di superficie mediante tamponi in rayon sterile strofinati su un'area di 100 cm², poi inseriti in 5 mL di brodo sterile Tryptone Soy Broth (TSB, Biolife, Monza, Italia), come precedentemente descritto [34,36,39]. Tutti i campioni raccolti sono stati immediatamente refrigerati a 2–10 °C e trasportati al laboratorio entro 12 ore. La pianta schematica dell'aula e i punti di campionamento sono mostrati nella Figura 2.

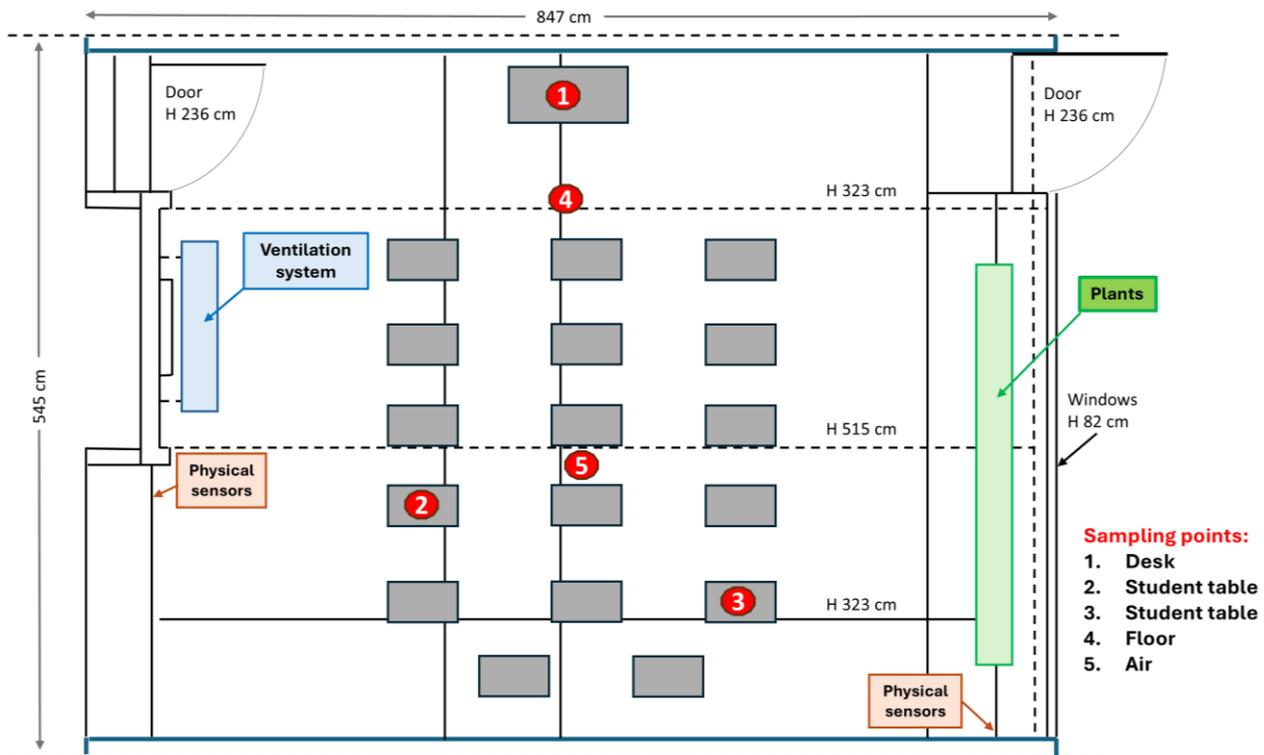


Figura 2. Pianta delle aule coinvolte nello studio, inclusa la localizzazione dei punti di campionamento.

2.4. Analisi microbiologiche

Le analisi microbiologiche sono state eseguite sulle piastre RODAC raccolte tramite adeguata incubazione e conteggio delle unità formanti colonia (CFU). In breve, i batteri sono stati incubati a 37 °C per 24 h o 48 h su terreni generali o selettivi, rispettivamente. I funghi sono stati incubati a 25 °C per 72 h. Al termine dell'incubazione, la crescita microbica è stata determinata tramite enumerazione delle CFU. Complessivamente, sono stati raccolti 2688 campioni microbiologici da superfici e aria, di cui 1280 durante T0, 256 durante T1 e T2, e 896 durante T3.

2.5. Analisi molecolari

Le analisi molecolari sono state effettuate sui tamponi raccolti nel brodo TSB. I campioni sono stati incubati a 37 °C per 24 h, e i microrganismi sono stati raccolti per centrifugazione (12.000× g per 5 min a 4 °C). Il DNA totale è stato estratto dai microrganismi pelletizzati utilizzando un kit commerciale (Exgene Cell SV mini kit, Gene All, Seoul, Corea del Sud), seguendo le istruzioni del produttore. Il DNA estratto è stato quantificato tramite lettura spettrofotometrica usando il nanodrop a una lunghezza d'onda di 260/280 nm, e l'amplificabilità del DNA è stata verificata mediante PCR qualitativa, amplificando una regione conservata nei batteri (*panB*), come già descritto [34,39]. Un microgrammo (1 µg) di DNA estratto è stato poi analizzato utilizzando il qPCR array "Microbial DNA qPCR Array for Antibiotic Resistance Genes" (Qiagen, Hilden, Germania), che consente la rilevazione e quantificazione simultanea di 84 geni di resistenza agli antibiotici (ARGs), come descritto precedentemente [34–37,39].

2.6. Analisi statistiche

Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il software GraphPad Prism 5.03 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). È stato utilizzato il test t di Student parametrico, assumendo come statisticamente significativo un valore di $p < 0,05$. Per analizzare i dati del resistoma, al valore rilevato nel test t di Student è stata applicata la correzione di Bonferroni per confronti multipli, considerando significativo un valore corretto p pari a 0,05.

3. Risultati

3.1. Carica microbica dell'ambiente scolastico

Per caratterizzare la qualità microbiologica dell'ambiente scolastico indoor e valutare l'impatto degli interventi "green" volti a migliorarla, è stato condotto uno studio caso-controllo pre-post in un liceo italiano da marzo 2023 a maggio 2024, escludendo il periodo delle vacanze estive, per un'indagine della durata totale di 10 mesi. Sono state coinvolte nello studio due aule con caratteristiche sovrapponibili: una ha ricevuto tre interventi sperimentali (aula test, TR) e l'altra non ha ricevuto alcun intervento, fungendo da controllo (aula di controllo, CR). Lo studio ha incluso quattro fasi consecutive durante le quali gli interventi sono stati implementati nella TR: (1) T0, che ha fornito i valori basali rilevati con la sanificazione e la ventilazione convenzionali tramite apertura delle finestre; (2) T1, durante la quale nella TR sono state introdotte piante da serra; (3) T2, durante la quale è stata installata la ventilazione meccanica dell'aria nella TR; e (4) T3, durante la quale la TR ha ricevuto la sanificazione PCHS, a base di probiotici, in sostituzione di quella convenzionale a base chimica.

Il microbioma dell'aula è stato monitorato per tutta la durata dello studio attraverso campagne di campionamento bimestrali distribuite uniformemente nel periodo di studio. In ciascuna campagna di campionamento, sono stati raccolti in duplicato cinque campioni ambientali dall'aria e dalle superfici (pavimento, banchi degli studenti e cattedra dell'insegnante), sia prima che dopo le lezioni degli studenti. I punti di superficie sono stati campionati simultaneamente con piastre a contatto RODAC e tamponi, rispettivamente per le analisi microbiologiche basate su coltura e le analisi molecolari basate su PCR.

I risultati del monitoraggio microbico sono stati simili nelle diverse campagne di campionamento effettuate all'interno di ciascun periodo. Inoltre, i campioni ambientali raccolti da superfici differenti (pavimento, banchi, cattedra) sono stati considerati congiuntamente, poiché rappresentavano la contaminazione complessiva dell'ambiente dell'aula. Sulla base di ciò, i risultati relativi alla carica microbica sono stati calcolati ed espressi come valori mediani di quelli rilevati nelle diverse campagne di campionamento incluse in ciascun periodo, mostrando separatamente i risultati relativi a superfici e aria.

A livello basale (T0), i risultati hanno evidenziato collettivamente la presenza di potenziali patogeni umani nell'ambiente dell'aula, come indicato dai conteggi di CFU sulle piastre RODAC (Figura 3). La carica microbica, espressa come somma dei patogeni ricercati, includeva funghi (inclusi *Aspergillus* spp.) e batteri (principalmente *Staphylococcus* spp., incluso *S. aureus*), e diversi livelli di contaminazione microbica sono stati rilevati sulle superfici e nell'aria, sia prima che dopo le lezioni. Non sono state osservate differenze significative tra TR e CR in nessun campione durante T0 ($p = n.s.$); pertanto, è stato calcolato un valore mediano complessivo per entrambe le aule coinvolte.

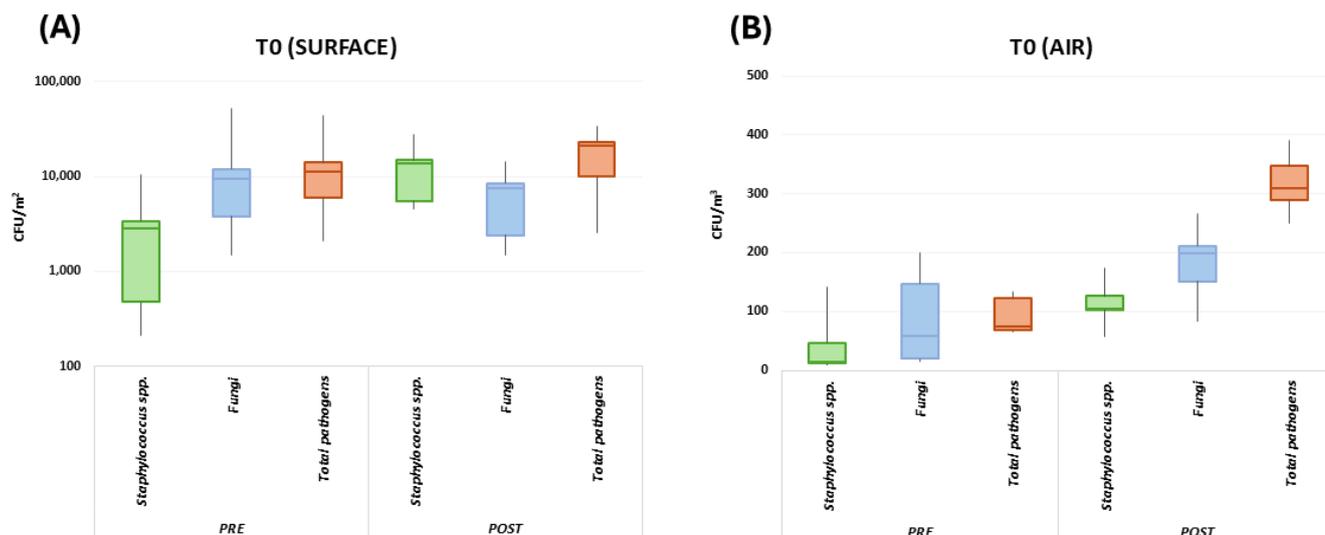


Figura 3. Livello basale della carica microbica patogena (T0). Sono mostrati i patogeni prevalenti e la somma di tutti i patogeni ricercati. I livelli di contaminazione sono illustrati come box plot con valori mediani, Q1, Q3, minimo e massimo di CFU/m² o CFU/m³ rilevati nei campioni di superficie (A) e aria (B), prima (pre) e dopo (post) le lezioni. Essendo sovrapponibili, i valori di CR e TR sono stati considerati insieme. *Staphylococcus* spp. sono rappresentati in verde, i funghi in blu e i patogeni totali in rosso.

In dettaglio, prima delle lezioni, la carica microbica superficiale al T0 corrispondeva a 12.421 CFU/m² (valore mediano, intervallo 3098–45.236 CFU/m²). Dopo il periodo di lezione (6 h), la contaminazione superficiale aumentava come previsto, probabilmente a causa della presenza degli studenti, raggiungendo 21.412 CFU/m² (valore mediano, intervallo 2540–33.947 CFU/m²) (Figura 3). Oltre alle prevedibili differenze quantitative attribuibili alla presenza umana, sono state osservate anche differenze qualitative nella composizione della carica microbica prima e dopo le lezioni. In dettaglio, prima delle lezioni, la carica superficiale era costituita essenzialmente da funghi (76,7% della popolazione totale, corrispondente a un valore mediano di 9526 CFU/m²), seguiti da *Staphylococcus* spp. (23,2% della carica microbica superficiale totale, pari a un valore mediano di 2881,7 CFU/m²). Dopo le lezioni, i funghi non erano più prevalenti sulle superfici, rappresentando il 35,6% dei patogeni totali (7622,7 CFU/m², valore mediano). Invece, gli stafilococchi aumentavano, costituendo il 64,4% della carica microbica totale (pari a un valore mediano di 13.789,3 CFU/m²).

La contaminazione dell'aria è risultata significativamente inferiore, poiché la carica microbica aerodispersa totale corrispondeva a 75 CFU/m³ (valore mediano, intervallo 65–134 CFU/m³) prima delle lezioni e 310 CFU/m³ (valore mediano, intervallo 250–391 CFU/m³) dopo le lezioni (Figura 3). La popolazione aerodispersa era attribuibile principalmente ai funghi, sia prima che dopo le lezioni. Da notare che *Aspergillus* spp. era rilevabile nei campioni d'aria, seppur a livelli bassi (0,01% dei miceti totali), evidenziando la presenza di questo importante patogeno umano in questo ambiente comunitario. Complessivamente, i miceti rappresentavano il 76,5% della popolazione microbica totale prima delle lezioni (corrispondente a un valore mediano di 57,4 CFU/m³) e il 64% dei microrganismi aerodispersi dopo le lezioni (valore mediano di 198,4 CFU/m³). Anche *Staphylococcus* spp. era ben rappresentato nella popolazione microbica aerodispersa, costituendo il 19,8% dei patogeni totali aerodispersi prima delle lezioni (14,9 CFU/m³, valore mediano) e il 33,7% dopo le lezioni (104,5 CFU/m³, valore mediano). Né batteri della famiglia *Enterobacteriaceae* né miceti del genere *Candida* sono stati rilevati al T0 nei

campioni di superficie o aria della TR o CR (valore mediano 0 CFU/m², intervallo 0–0 CFU/m²).

Al T1 (Figura 4), non sono state osservate variazioni significative nella CR rispetto ai valori basali rilevati al T0 (CRT1 vs. CRT0, $p = n.s.$). La carica microbica superficiale totale corrispondeva infatti a 12.689 CFU/m² prima delle lezioni e 17.898 CFU/m² dopo le lezioni. Come osservato al T0, prima delle lezioni, la comunità microbica superficiale era rappresentata principalmente da funghi (71,5%, 9072,6 CFU/m²), seguiti da stafilococchi (28,5%, 3616,4 CFU/m²), mentre dopo le lezioni gli stafilococchi diventavano prevalenti (64,9%, 11.615,8 CFU/m²) e i funghi diminuivano in abbondanza relativa (35%, 6264,3 CFU/m³). Anche i livelli di carica microbica aerodispersa erano molto simili a quelli osservati al T0, corrispondendo a 74 CFU/m³ prima delle lezioni e 290 CFU/m³ dopo le lezioni. I funghi erano prevalenti nell'aria sia prima (75,1%, 55,6 CFU/m³) che dopo le lezioni (63,6%, 184,4 CFU/m³), come anche rilevato al T0.

Al contrario, alcune alterazioni microbiche sono state osservate nella TR a seguito della collocazione delle piante verdi (T1). In primo luogo, è stato osservato un aumento complessivo della carica microbica sulle superfici rispetto al T0 (15.473,7 vs. 12.421 CFU/m²), attribuibile principalmente a una maggiore presenza di stafilococchi, la cui quantità corrispondeva a un valore mediano di 14.130,2 CFU/m² (rispetto a 2881 CFU/m²; $p < 0,001$), rappresentando così la vasta maggioranza della carica microbica superficiale anche prima delle lezioni (91,3%). Dopo le lezioni, la carica microbica superficiale totale aumentava ulteriormente, con 18.549 CFU/m² (valore mediano), e *Staphylococcus* spp. rappresentava il 96,6% della popolazione microbica totale (17.918,3 CFU/m², valore mediano). I funghi rappresentavano quindi una frazione molto ridotta della carica microbica superficiale, sia prima (7,8%; 1206,9 CFU/m²) che dopo le lezioni (2,5%; 463,7 CFU/m²). Al contrario, la contaminazione aerodispersa totale appariva ridotta nella TR al T1 rispetto ai valori di controllo sia prima delle lezioni (61 CFU/m³ vs. 74 CFU/m³; $p = n.s.$) che dopo le lezioni (157,5 CFU/m³ vs. 290 CFU/m³; $p < 0,05$). Da notare che la componente fungina è stata particolarmente influenzata, rappresentando solo il 56% della carica microbica totale prima delle lezioni, corrispondente a 34 CFU/m³ (invece del 71,5% e 55,6 CFU/m³ per il controllo). Dopo le lezioni, l'abbondanza relativa dei funghi diminuiva ulteriormente, rappresentando il 36,9% della carica microbica totale, corrispondente a 58,1 CFU/m³, rispetto ai 184,4 CFU/m³ del controllo. L'introduzione delle piante verdi nella TR è stata quindi associata a una riduzione complessiva della contaminazione fungina pari al 38,8% ($p < 0,05$) prima delle lezioni e al 68,4% ($p < 0,01$) dopo le lezioni, rispetto ai valori della CR.

Al T2, è stato installato nella TR un sistema di ventilazione meccanica che consentiva un flusso costante di 440 m³/h di aria fresca (stessa portata per l'aria espulsa) durante l'orario delle lezioni. La presenza della ventilazione meccanica manteneva costanti i livelli di temperatura e umidità, rispettivamente a 21–23 °C e 40–45%, mentre nella CR la temperatura e l'umidità fluttuavano continuamente, aumentando fino a 25 °C e 65%. Il monitoraggio microbiologico ha evidenziato una chiara riduzione dei patogeni associata a questo intervento. In particolare, prima delle lezioni, la carica microbica superficiale della TR corrispondeva a 3998,9 CFU/m² (valore mediano; intervallo 1052,63–4578,94 CFU/m²), rispetto ai 13.368,4 CFU/m² rilevati nella CR (valore mediano; intervallo 2549–25.621,5 CFU/m²), con una riduzione significativa del 70% ($p < 0,01$). Dopo le lezioni, il valore mediano di contaminazione superficiale nella TR corrispondeva a 5789,5 CFU/m² (valore mediano, intervallo 3578,9–6889,5 CFU/m²), rispetto ai 15.263,2 CFU/m² misurati nella CR (valore mediano; intervallo 6521,7–23.121 CFU/m²), confermando che l'introduzione della ventilazione meccanica ha ridotto significativamente la contaminazione superficiale anche in presenza degli studenti (–62,1%; $p < 0,05$) (Figura 4).

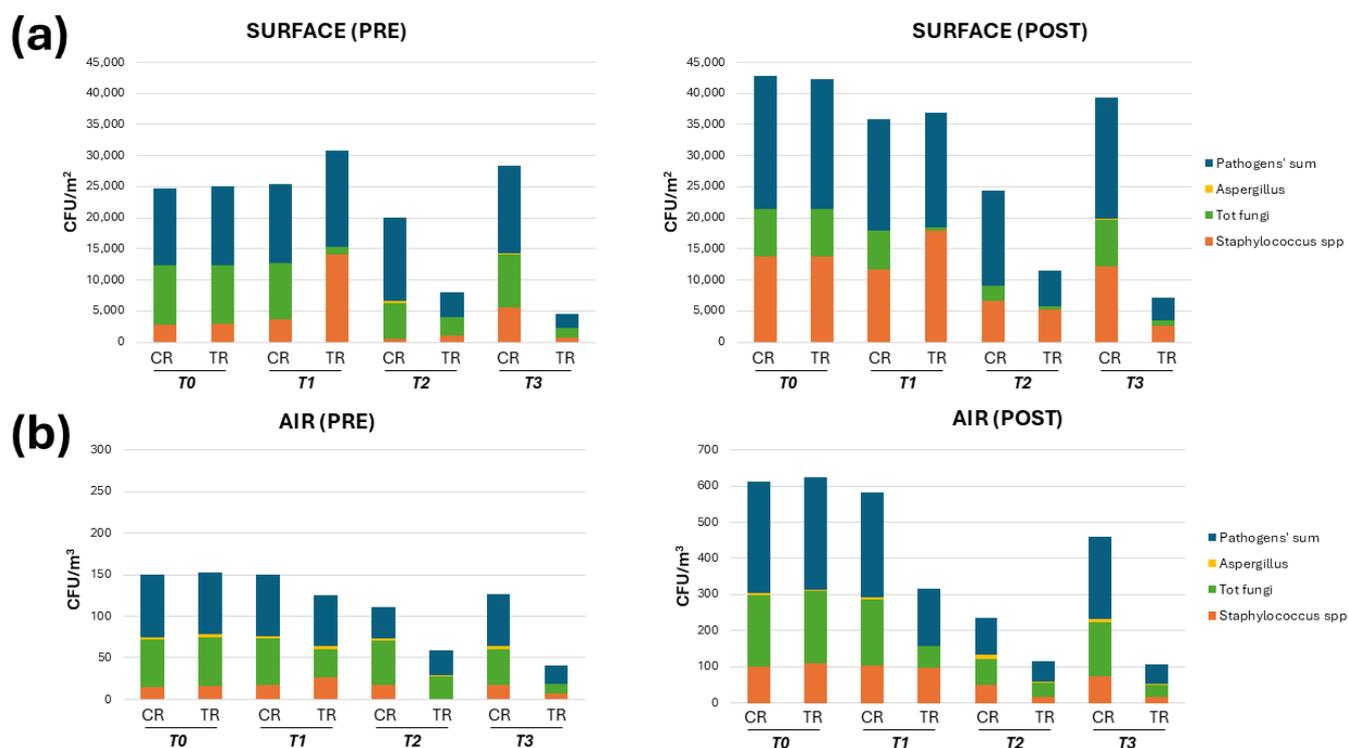


Figura 4. Carica microbica patogena nelle aule CR e TR. Sono mostrate la presenza e la proporzione dei patogeni totali e individuali durante tutti i periodi dello studio (T0, T1, T2 e T3). I risultati sono espressi come somma dei valori medi ottenuti dal campionamento RODAC e dal conteggio delle CFU su superfici (a) e nell'aria (b), prima (pre) e dopo (post) le lezioni.

L'abbondanza relativa delle principali componenti microbiche era simile a quella osservata al T0, nonostante la presenza continua delle piante. In particolare, nella TR, i funghi erano prevalenti prima delle lezioni, rappresentando il 73% dei patogeni totali sulle superfici (2919,2 CFU/m²), mentre gli Stafilococchi diventavano prevalenti dopo le lezioni (89%) (5152,7 CFU/m²). È stata inoltre osservata una chiara riduzione della carica microbica aerodispersa nella TR rispetto al controllo. In dettaglio, la carica microbica aerodispersa nella TR corrispondeva a 28,5 CFU/m³ prima delle lezioni (valore mediano, intervallo 21–32 CFU/m²) e a 58 CFU/m³ dopo le lezioni (valore mediano, intervallo 45–65 CFU/m³), mentre nella CR corrispondeva a 38 CFU/m³ prima delle lezioni (intervallo 29–61 CFU/m³) e a 101 CFU/m³ dopo le lezioni (intervallo 75–221 CFU/m³). Confrontando i valori di TR e CR, la carica microbica aerodispersa si è ridotta del 26% prima delle lezioni e del 42,63% dopo le lezioni ($p < 0,05$). Nell'aria della TR, i funghi sono rimasti prevalenti sia prima (93%) che dopo le lezioni (66,6%), come anche osservato nell'ambiente CR, sebbene il numero di CFU fosse diminuito (26,5 vs. 52,2 CFU/m³ e 38,6 vs. 70,7 CFU/m³ nei valori TR vs. CR rispettivamente prima e dopo le lezioni).

Al T3, è stata implementata nella TR la sanificazione a base di probiotici (PCHS) in sostituzione di quella chimica convenzionale. Come previsto, sulla base di risultati precedenti, questo intervento è stato associato a cambiamenti significativi nella carica microbica ambientale della TR rispetto al controllo (Figura 5). Nella CR, la contaminazione superficiale era in linea con quanto osservato nei periodi precedenti, corrispondendo a 14.105 CFU/m² prima delle lezioni (valore mediano; intervallo 11.256–28.456,3 CFU/m²) e a 19.631,8 CFU/m² dopo le lezioni (valore mediano; intervallo 12.589,6–31.102 CFU/m²). I funghi erano prevalenti prima dell'arrivo degli studenti (60% della carica microbica

superficiale totale, pari a 8463 CFU/m²), mentre gli Stafilococchi diventavano prevalenti successivamente (62%; 12.173,6 CFU/m²). Al contrario, i livelli rilevati nella TR mostravano una diminuzione significativa di tutti i patogeni superficiali, corrispondenti a 2315,8 CFU/m² prima delle lezioni (valore mediano, intervallo 1473,7–4263,2 CFU/m²) e a 3578,9 CFU/m² (valore mediano, intervallo 1136,8–5105,3 CFU/m²) dopo le lezioni. I valori della TR erano quindi inferiori rispetto a quelli della CR, con una riduzione dell'83,5% prima delle lezioni e dell'81,8% dopo le lezioni ($p < 0,0001$). D'altra parte, le proporzioni delle diverse componenti microbiche sono state mantenute, con i funghi che rappresentavano il 68% della carica microbica superficiale totale prima delle lezioni (1574 CFU/m², valore mediano) e gli Stafilococchi che diventavano prevalenti dopo le lezioni (75%; 2684 CFU/m², valore mediano). La diminuzione della carica patogena è stata accompagnata da un aumento progressivo di *Bacillus* spp. derivanti dal PCHS, che hanno raggiunto 7578,9 CFU/m² alla fine del periodo T3, rappresentando così il 76,6% e il 67% dei microrganismi totali rilevati nell'aula rispettivamente prima e dopo le lezioni.

Anche i livelli di contaminazione dell'aria sono diminuiti sensibilmente rispetto alla CR, poiché i patogeni aerodispersi della TR corrispondevano a 22 CFU/m³ prima delle lezioni (valore mediano, intervallo 9–69 CFU/m³) e a 53 CFU/m³ dopo le lezioni (valore mediano, intervallo 15–81 CFU/m³). Al contrario, in linea con i periodi precedenti, la CR presentava 63 CFU/m³ di patogeni aerodispersi prima delle lezioni (valore mediano; intervallo 18–101 CFU/m³) e 228 CFU/m³ dopo le lezioni (valore mediano; intervallo 141,2–352 CFU/m³). I funghi erano prevalenti sia prima che dopo le lezioni nella CR (68% e 66,8%, rispettivamente) e nella TR, dove rappresentavano rispettivamente il 51% e il 64% dei patogeni aerodispersi totali. Di rilievo, mentre *Aspergillus* è stato rilevato nella CR con un valore mediano di 3 CFU/m³ (intervallo 0–5 CFU/m³), non è stato rilevato alcun *Aspergillus* nella TR (valore mediano 0 CFU/m³, intervallo 0–0 CFU/m³). Sulla base dei valori di CFU rilevati, la riduzione della contaminazione dell'aria è stata del 65,1% prima delle lezioni e del 76,8% dopo le lezioni ($p < 0,001$). La Figura 5 evidenzia specificamente le differenze tra i livelli di carica microbica nella TR e nella CR nell'ultimo periodo di studio T3.

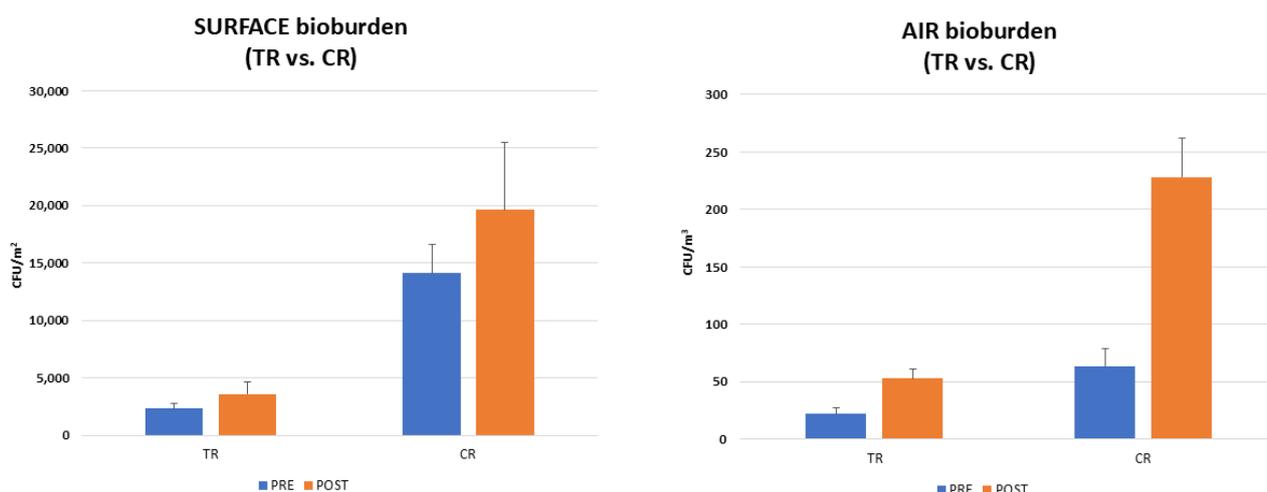


Figura 5. Carica microbica superficiale e aerodispersa al T3 nelle aule TR e CR. I risultati sono espressi come valori mediani di CFU/m² ± DS (superficie) e CFU/m³ ± DS (aria) rilevati prima (pre) e dopo (post) le lezioni.

3.2. Caratterizzazione del resistoma del bioburden delle aule scolastiche

I campioni del pavimento, essendo quelli con la carica microbica più abbondante, sono stati anche analizzati mediante qPCR microarray per profilare i geni di resistenza agli antibiotici (ARGs) presenti nella popolazione microbica che colonizza in modo persistente l'ambiente dell'aula. I risultati hanno evidenziato una presenza bassa ma rilevabile di diversi ARGs nei microbi dell'aula, conferenti resistenza ad antibiotici appartenenti a diverse classi, tra cui amminoglicosidi, tetracicline, beta-lattamici (inclusa la meticillina) e macrolidi. I principali ARGs rilevati e le loro funzioni sono riassunti nella Tabella 2.

Tabella 2. Elenco degli ARG più rilevati e funzioni codificate.

| ARGs | Antibiotico/Funzione gene | Riferimento bibliografico |
|------------------------|--|-------------------------------------|
| <i>aadA1</i> | Amminoglicosidi | Hollingshead et al., 1985 [44] |
| <i>aphA6</i> | Amminoglicosidi | Aris et al., 2019 [45] |
| <i>CTX-M-9 Group</i> | Beta-lattamasi di classe A | Sun et al., 2010 [46] |
| <i>GES</i> | Beta-lattamasi di classe A | Lee et al., 2005 [47] |
| <i>IMI & NMC-A</i> | Beta-lattamasi di classe A | Walther-Rasmussen et al., 2007 [48] |
| <i>SFO-1</i> | Beta-lattamasi di classe A | Matsumoto et al., 1999 [49] |
| <i>SHV (238G240K)</i> | Beta-lattamasi di classe A | Caselli et al., 2016 [39] |
| <i>Per-1 group</i> | Beta-lattamasi di classe A | Aly et al., 2016 [50] |
| <i>VIM-7</i> | Beta-lattamasi di classe B | Toleman et al., 2004 [51] |
| <i>IMP-5 group</i> | Beta-lattamasi di classe B | Brizio et al., 2006 [52] |
| <i>ACT 5/7 group</i> | Beta-lattamasi di classe C | Guan et al., 2024 [53] |
| <i>FOX</i> | Beta-lattamasi di classe C | Gonzalez Leiza et al., 1994 [54] |
| <i>LAT</i> | Beta-lattamasi di classe C | Tzouveleakis et al., 1994 [55] |
| <i>MIR</i> | Beta-lattamasi di classe C | Papanicolaou et al., 1990 [56] |
| <i>MOX</i> | Beta-lattamasi di classe C | Oguri et al., 2014 [57] |
| <i>OXA-2 Group</i> | Beta-lattamasi di classe D | Bhattacharjee et al., 2015 [58] |
| <i>OXA-23 Group</i> | Beta-lattamasi di classe D | Smith et al., 2013 [59] |
| <i>OXA-55</i> | Beta-lattamasi di classe D | Héritier et al., 2004 [60] |
| <i>QnrB-8 group</i> | Fluoroquinoloni | Rezazadeh et al., 2016 [61] |
| <i>ermA</i> | Macrolidi lincosamidi streptogramine_b | Malhotra-Kumar et al., 2009 [62] |
| <i>ermB</i> | Macrolidi lincosamidi streptogramine_b | Min et al., 2008 [63] |
| <i>ermC</i> | Macrolidi lincosamidi streptogramine_b | Shivakumar et al., 1981 [64] |
| <i>mefA</i> | Macrolidi lincosamidi streptogramine_b | Daly et al., 2004 [65] |
| <i>msrA</i> | Macrolidi lincosamidi streptogramine_b | Poole et al., 2005 [66] |
| <i>tetB</i> | Pompa di efflusso delle Tetracicline | Warburton et al., 2013 [67] |
| <i>mecA</i> | Meticillina | Utsui et al., 1985 [68] |

Nella CR, l'abbondanza di geni di resistenza agli antibiotici (ARGs) rilevata al T0 è rimasta pressoché invariata per tutta la durata dello studio, mentre nella TR sono state osservate alcune variazioni rilevanti in seguito all'introduzione degli interventi pianificati (Figura 6). Al T0, sia la TR che la CR mostravano la presenza degli stessi ARGs, senza differenze significative. I geni di resistenza prevalenti prima delle lezioni includevano, in ordine di abbondanza (espressa come variazione logaritmica in base 10, Log_{10} fold change, FC, rispetto al controllo negativo NTC), *msrA* (4,2 Log_{10} FC), *ermB* (1,9 Log_{10} FC), *aphA6* (1,7 Log_{10} FC) e *mecA* (1,16 Log_{10} FC), seguiti da *aadA1* (0,9 Log_{10} FC), gruppo Per-1 (0,5 Log_{10} FC) e gruppo OXA-2 (0,45 Log_{10} FC). *S. aureus* e i suoi geni di virulenza *spa* e *luk* (inclusi nel microarray) sono stati anch'essi rilevati con alta frequenza (4,47 Log_{10} FC). Da notare che *mecA* è stato rilevato nell'ambiente scolastico, suggerendo la probabile presenza di MRSA (*S. aureus* resistente alla meticillina). Dopo la frequentazione degli studenti, sono comparsi ulteriori ARGs, probabilmente come conseguenza della diffusione dei batteri degli studenti. I geni di resistenza più prevalenti dopo le lezioni

includevano *mefA* (5 Log₁₀ FC), *mnrA* (3,1 Log₁₀ FC), gruppo ACT 5/7 (3,03 Log₁₀ FC), *ermB* (1,9 Log₁₀ FC), *FOX* (1,7 Log₁₀ FC), *ermC* (1,7 Log₁₀ FC) e *tetB* (1,3 Log₁₀ FC).

Al T1, dopo l'introduzione delle piante, è stata osservata una riduzione di alcuni ARGs nella TR, mentre *ermB* (4,5 Log₁₀ FC) e *mecA* (2,9 Log₁₀ FC) risultavano leggermente aumentati, probabilmente come conseguenza dell'aumento del numero di Staphylococchi osservato nella TR durante la fase T1 dello studio. Nessuna differenza osservata è risultata statisticamente significativa. Dopo le lezioni, rispetto a quanto osservato al T0, alcuni ARGs sono risultati ridotti fino a 2 Log (ACT 5/7, FOX, *ermB*, *mefA*), ma ne sono comparsi di nuovi, tra cui *aphA6* (2,08 Log₁₀ FC), gruppo CTX-M-9 (4,9 Log₁₀ FC) e VIM-7 (4,7 Log₁₀ FC).

Al T2, con l'installazione del sistema di ventilazione meccanica, il numero di ARGs appariva ridotto rispetto al T0, sia prima che dopo le lezioni, probabilmente in associazione con la diminuzione osservata della carica microbica totale tramite i conteggi di CFU. Tuttavia, mentre *aadA1*, *aphA6* ed *ermB* risultavano diminuiti fino a -1,5 Log₁₀ FC prima delle lezioni, i gruppi CTX-M-9 e *mefA* risultavano aumentati di circa 2 Log₁₀ FC rispetto al T0. Dopo le lezioni, è stata registrata una riduzione marcata di quasi tutti gli ARGs rilevati al T0, ad eccezione di *ermC*, *mnrA* e *mecA*, che risultavano aumentati di circa 1 Log₁₀ ciascuno.

Al contrario, al T3, l'introduzione della sanificazione con PCHS è stata associata a una diminuzione complessiva di tutti gli ARGs rilevati al T0, T1 e T2 prima delle lezioni (fino a -99,9%, pc < 0,001). La riduzione è risultata evidente anche dopo le lezioni, quando tutti gli ARGs identificati nei periodi precedenti risultavano significativamente ridotti (fino a -3 Log₁₀), confermando così il significativo impatto della sanificazione a base di probiotici nella prevenzione della diffusione di microrganismi resistenti agli antibiotici, sia in ambienti sanitari che non sanitari.

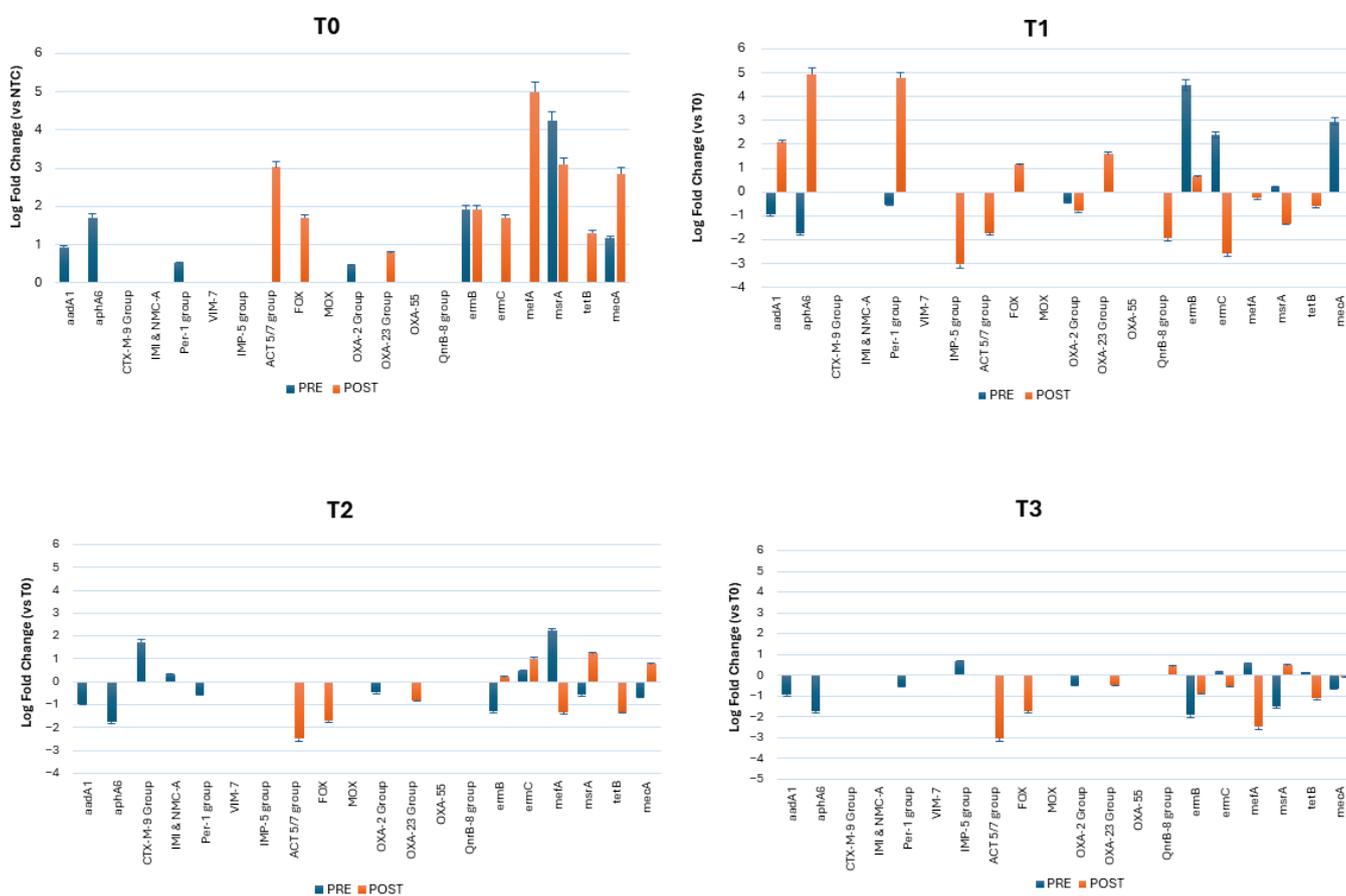


Figura 6. Caratterizzazione del resistoma nell'aula TR. Gli ARGs sono stati rilevati tramite qPCR microarray, eseguito su campioni del pavimento nei tempi indicati (T0, T1, T2 e T3), prima (pre) e dopo (post) le lezioni. I risultati sono espressi come valori medi \pm DS della variazione logaritmica in base 10 (Log_{10} fold change, FC) per ciascun ARG. I valori di T0 sono stati ottenuti per il confronto con i valori del controllo negativo (NTC), mentre i valori di T1, T2 e T3 sono stati ottenuti per il confronto con i valori di T0, come indicato sull'asse delle ordinate (y).

Da notare che, mentre le differenze osservate tra TR e CR non erano significative a T0 e T1, sono diventate statisticamente significative sia a T2 che a T3 ($0,05 < pc < 0,001$) (Figura 7). In particolare, al T3, le differenze sono risultate significative per tutti gli ARGs rilevati sia prima che dopo le lezioni. Analogamente, la presenza di *S. aureus* virulento (associato ai geni di virulenza spa e luk F) è risultata significativamente ridotta solo al T3, nella TR rispetto alla CR.

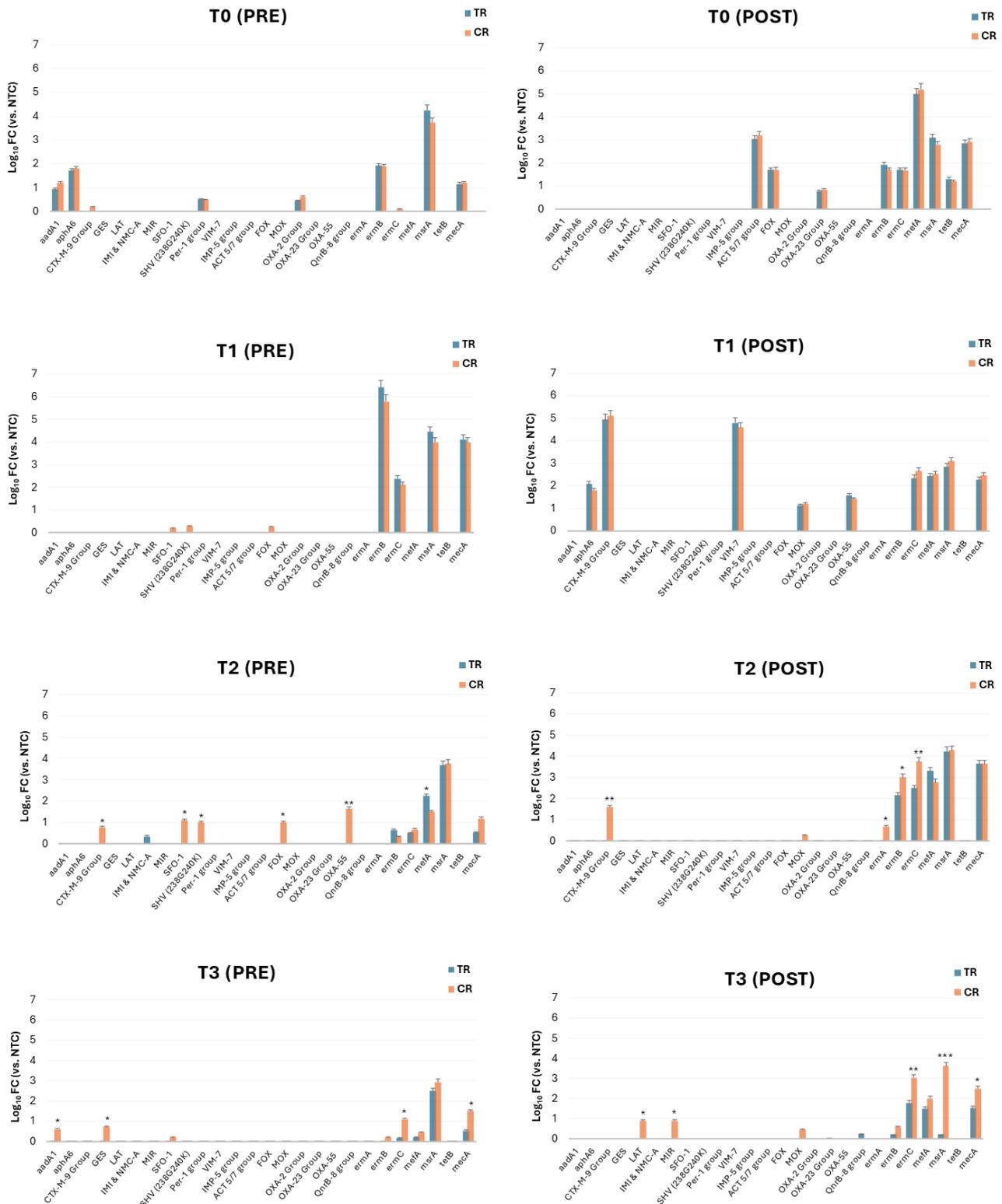


Figure 7. Caratterizzazione del resistoma nelle aule TR e CR. Gli ARGs sono stati quantificati tramite qPCR microarray eseguito su campioni del pavimento nei tempi indicati (T0, T1, T2 e T3), prima (pre) e dopo (post) le lezioni. I risultati sono espressi come valori medi \pm DS della variazione logaritmica (Log₁₀ fold change, FC) rispetto al NTC per ciascun ARG indicato. Gli asterischi indicano differenze statisticamente significative tra i valori di TR e CR (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

4. Discussione

Tra gli ambienti costruiti (Built Environments, BE) ad alta frequentazione, le scuole rappresentano quelli in cui gli esseri umani trascorrono la maggior parte del tempo durante la fase educativa della loro vita. I microrganismi sono stati rilevati in modo persistente sulle superfici e nell'aria dell'ambiente scolastico, dove sono stati associati all'insorgenza di varie patologie in questa fascia d'età [1,11,12,18]. Di conseguenza, il monitoraggio del microbioma scolastico può essere importante per mantenere un ambiente di apprendimento sano e prevenire l'insorgenza di malattie negli studenti e nel personale docente. È noto che i microbiomi indoor sono influenzati dal tipo di ventilazione, dalle caratteristiche edilizie e dalle modalità di pulizia. Un flusso d'aria inadeguato è infatti associato a complicazioni sanitarie [14,69], e l'introduzione di piante è considerata un possibile strumento per migliorare la qualità dell'aria e la performance cognitiva degli studenti [70,71]. Inoltre, il controllo della carica microbica è stato finora affrontato mediante disinfezione chimica convenzionale, che può aumentare gli inquinanti chimici e favorire la selezione di microbi resistenti ai farmaci [72–74]. Al contrario, i sistemi di pulizia sostenibili a base di probiotici (PCHS) si sono dimostrati un'alternativa promettente, capaci di controllare stabilmente la carica microbica senza selezionare l'antibiotico-resistenza (AMR) [34–37,39,40,42,43,75].

In questo studio, abbiamo quindi indagato gli effetti di diversi interventi (introduzione di piante, sistemi di ventilazione meccanica e sanificazione PCHS) sul microbioma scolastico attraverso uno studio caso-controllo pre-post in un liceo italiano.

I risultati raccolti a livello basale in entrambe le aule coinvolte (TR e CR) hanno mostrato la presenza di diversi patogeni potenziali sia sulle superfici che nell'aria. La carica microbica superficiale totale era coerente con quanto misurato in ambienti non sanitari [76,77], con oltre 12.000 CFU/m² prima dell'ingresso degli studenti e circa 20.000 CFU/m² dopo sei ore di presenza continua degli occupanti (studenti e insegnanti). Funghi e Stafilococchi erano i microrganismi prevalenti, in linea con quanto osservato in precedenza. I funghi rappresentavano oltre il 75% della carica microbica superficiale prima delle lezioni e *Staphylococcus* spp. oltre il 60% della carica microbica totale dopo le lezioni. Di rilievo, le specie di *Aspergillus* sono state rilevate quasi sempre nella popolazione fungina residente, sollevando potenziali rischi per la salute degli occupanti. Infatti, alcune specie di *Aspergillus* possono essere pericolose per l'uomo, agendo da patogeni opportunisti e causando infezioni polmonari invasive e malattie allergiche, soprattutto nei soggetti fragili [78]. Questi risultati sono coerenti con quelli ottenuti in altri studi, in particolare nelle scuole con ventilazione inadeguata e alta umidità [79–81], e supportano ulteriormente il fatto che i batteri di origine umana siano comuni negli spazi frequentati da persone (inclusi gli studenti) [82,83].

Di rilievo, diversi geni di resistenza agli antibiotici (ARGs) sono stati identificati nella popolazione microbica che persiste nell'ambiente scolastico, confermando che l'AMR non è più confinata agli ospedali ma si sta diffondendo anche in ambienti non sanitari. Gli ARGs prevalenti includevano geni che conferiscono resistenza a diverse classi di antibiotici, tra cui beta-lattamici, aminoglicosidi e macrolidi. È stata rilevata anche la resistenza alla meticillina, probabilmente riconducibile alla presenza di *S. aureus* meticillino-resistente (MRSA) [84]. Questo risultato evidenzia ulteriormente la diffusione di MRSA nella popolazione generale e in ambienti comunitari, in linea con precedenti studi condotti su microbi resistenti nelle scuole [85–87] e in spazi comunitari ad alta frequentazione [35].

L'introduzione delle piante *Golden pothos* e *Tillandsia kammii* Rauh, scelte principalmente per la loro resistenza e idoneità al verde verticale, ha causato uno spostamento inatteso nella popolazione microbica della TR, con un aumento significativo della componente stafilococcica e una riduzione concomitante di quella fungina. Ciò può

essere attribuito all'impatto potenziale delle piante sulla dinamica microbica dell'aula, attraverso modifiche nei fattori ambientali in grado di rallentare la proliferazione fungina o mediante il rilascio di specie batteriche dal microbioma delle piante, come già osservato in studi precedenti [20]. In particolare, variazioni nei parametri fisici (come temperatura e umidità relativa), nonché il rilascio di composti organici volatili (VOC) e altri fattori di origine vegetale, possono aver creato un ambiente favorevole alla crescita degli Stafilococchi ma non dei funghi, che tendono a proliferare in condizioni più umide [88]. Inoltre, specifici batteri associati alle piante potrebbero aver competuto con i funghi, contribuendo all'aumento osservato di *Staphylococcus* spp.. Questa ipotesi è coerente con studi precedenti che hanno dimostrato che i batteri associati alle piante possono colonizzare efficacemente gli ambienti interni [20,89] e competere con i funghi per i nutrienti e lo spazio. Tuttavia, poiché non è stata effettuata un'identificazione completa di tutte le specie batteriche, al momento non è possibile determinare se i batteri aumentati fossero *Stafilococchi* ambientali o cocci di origine umana; ulteriori analisi dettagliate (incluso il sequenziamento dell'intero genoma, WGS) dovrebbero essere eseguite per esplorare più a fondo questo aspetto e chiarire l'origine delle dinamiche microbiche osservate.

L'installazione di sistemi di ventilazione meccanica è invece riconosciuta come un fattore in grado di influenzare significativamente il microbioma indoor e, coerentemente, al T2 è stata osservata una riduzione significativa della contaminazione nella TR rispetto alla CR. Più precisamente, è stata osservata una diminuzione del 70% e del 62% nella popolazione microbica totale rilevata prima e dopo le lezioni, confermando che la ventilazione meccanica può prevenire efficacemente l'eccessiva contaminazione, probabilmente attraverso il controllo di fattori ambientali favorevoli alla crescita di patogeni, come temperatura e umidità [90]. Tutti i dettagli dei sistemi di ventilazione adottati sono descritti in un articolo complementare [91]. In particolare, durante la prima fase, la ventilazione era garantita da apertura di finestre e porte, con una portata d'aria altamente variabile nel tempo, anche in funzione delle condizioni climatiche esterne e della durata dell'apertura delle finestre. Con l'introduzione della ventilazione meccanica, la portata dell'aria è stata impostata a 440 m³/h, equivalente a 24 m³/h per persona (17 studenti e 1 insegnante—6,7 L/s per persona), in conformità con gli standard nazionali europei (UNI EN 16798-1) [92], che prevedono un ricambio minimo di 4 L/s (14,4 m³/h) per persona nelle scuole. I dati relativi a CO₂, temperatura e umidità relativa hanno mostrato che l'umidità relativa era significativamente più bassa nella TR, dove non superava il 45%, rispetto alla CR, dove raggiungeva costantemente il 65%. Questo parametro, insieme alla temperatura (mantenuta tra 21–23 °C), può aver influito significativamente sulla crescita dei microrganismi nella TR. Inoltre, il monitoraggio accurato della concentrazione di CO₂ [91] ha evidenziato che le concentrazioni di CO₂ si sono ridotte significativamente nella TR con ventilazione meccanica (<1300 ppm-v) rispetto alla ventilazione naturale (4500 ppm-v), con una riduzione media della concentrazione del 62%, con potenziali benefici per il benessere psicologico e l'apprendimento.

Al T3, sono stati osservati ulteriori cambiamenti significativi, associati all'introduzione del sistema PCHS in sostituzione della sanificazione chimica convenzionale a base di alcol denaturato per gli arredi e cloro per i pavimenti. I risultati hanno evidenziato una riduzione significativa dei patogeni superficiali pari all'83% prima delle lezioni e all'81% dopo le lezioni, rispetto a quanto rilevato nella CR ($p < 0,001$). Il PCHS, introducendo probiotici benefici del genere *Bacillus*, è stato precedentemente riconosciuto come uno strumento efficace per controllare stabilmente la colonizzazione da parte di patogeni negli ambienti trattati [27,34,36,37,39,42,43,93,94] tramite competizione attiva con i patogeni circostanti. I nostri dati confermano i risultati ottenuti in altri

ambienti comunitari [35], mostrando un effetto stabilizzante significativo del PCHS sia sulle superfici che nell'aria, prima e dopo le lezioni, associato all'aumento di *Bacillus* nell'ambiente trattato. In particolare, il basso numero di patogeni rilevati dopo le lezioni evidenzia la capacità del PCHS di prevenire la ricontaminazione dell'ambiente trattato, nonostante la continua diffusione microbica associata alla presenza degli studenti. Questi dati supportano quindi l'utilità del PCHS in ambienti non sanitari ad alta frequentazione, per proteggere l'ambiente a lungo termine da contaminazioni potenzialmente dannose [34–37,39,42,43,75]. Inoltre, considerando che l'abbondanza di *Bacilli* indoor è stata significativamente associata alla diversità del microbioma intestinale e all'indice di salute del microbioma intestinale [95], questi dati possono anche avere rilevanza nel miglioramento della salute generale degli studenti. Inoltre, l'analisi del resistoma ha mostrato che l'applicazione del PCHS è stata associata a una riduzione complessiva di tutti gli ARGs rilevati nell'ambiente scolastico fino a 3 Log₁₀ nei periodi precedenti, confermando che può essere uno strumento importante per contrastare la diffusione dell'AMR nella comunità. Pertanto, la pulizia probiotica è risultata compatibile con la presenza del sistema di ventilazione meccanica (che non ha ostacolato la colonizzazione dei *Bacillus* derivanti dal PCHS) e potrebbe contribuire ulteriormente alla riduzione di patogeni e AMR in modalità sinergica. I nostri dati sul microbioma scolastico sono coerenti con quanto riportato in precedenti studi, sebbene un confronto diretto sia difficile poiché la maggior parte dei dati pubblicati deriva da analisi NGS, mentre noi abbiamo quantificato i contaminanti microbici tramite conteggio CFU. Nonostante queste differenze metodologiche, Staphylococchi e altri batteri di origine umana sono stati segnalati come principale fonte batterica nelle aule, insieme a funghi attribuibili prevalentemente all'ambiente esterno [96]. Da notare che la componente batterica/fungina del microbioma scolastico indoor è stata associata a malattie respiratorie [97,98], mentre una maggiore biodiversità del microbioma è stata invece suggerita come fattore protettivo per studenti e personale scolastico [97]. Vari studi hanno dimostrato che la presenza di piante verdi è associata a un aumento dei taxa batterici [99], e ulteriori ricerche saranno necessarie per analizzare in dettaglio la composizione tassonomica legata alle piante nel microbioma indoor e per esplorarne l'impatto sulla salute. Altri studi hanno confermato che le piante da interno possono arricchire la diversità microbica degli ambienti costruiti [100] e favorire il potenziamento dei microbi commensali della pelle e la regolazione del sistema immunitario [101]. Infine, le piante verdi sono state anche associate a una riduzione del 10% della CO₂ e a temperature più stabili [102].

La ventilazione è stata inoltre segnalata come fattore capace di influenzare batteri e funghi su superfici e nell'aria, potenzialmente associati a sintomi respiratori nelle aule scolastiche [103], e di impattare su CO₂, temperatura e umidità dell'aria indoor [104], rafforzando quanto osservato in questo studio. Non sono disponibili in letteratura studi sull'uso di PCHS negli ambienti scolastici indoor, ma diversi studi sono stati condotti in ambienti sanitari e non, mostrando una significativa riduzione dei patogeni potenziali su superfici e nell'aria [27,34–37,39,42,43,93]. I principali studi pubblicati sul microbioma indoor in ambienti comunitari sono riassunti nella Tabella 3 e sottolineano l'importanza complessiva di comprendere l'interazione tra il microbioma interno e le caratteristiche ambientali (piante, umidità relativa, confinamento edilizio e concentrazione di CO₂) nella progettazione di strategie di prevenzione delle malattie [3].

Tabella 3. Principali studi pubblicati sul microbioma indoor in ambienti comunitari.

| Sede | Obiettivo dello studio | Metodo di analisi | Risultati Primari | Riferimenti bibliografici |
|------|------------------------|-------------------|-------------------|---------------------------|
|------|------------------------|-------------------|-------------------|---------------------------|

| | | | | | |
|---------------------------|------------|--|--|--|------------------------------|
| Scuole (Corea) | Elementari | Monitoraggio microbiologico | mi-NGS (16S rRNA/ITS) | <ul style="list-style-type: none"> Batteri di origine umana Funghi per lo più attribuiti all'ambiente esterno | Lee et al., 2021 [96] |
| Scuole (USA) | Elementari | Impatto del microbioma indoor sulle infezioni respiratorie | NGS (16S rRNA/ITS) | <ul style="list-style-type: none"> Il microbioma indoor con elevata biodiversità può fornire una migliore protezione contro le infezioni respiratorie | Park et al., 2025 [97] |
| Locali (Cina) | Dormitorio | Impatto del microbioma indoor sulle riniti | NGS (16S rRNA) | <ul style="list-style-type: none"> Microbioma Indoor associato a riniti (taxa specifici) | Fu et al., 2024 [98] |
| 155 Abitazioni (Belgio) | | Impatto delle piante sul microbioma indoor | NGS (16S rRNA/ITS); qPCR | <ul style="list-style-type: none"> Piante associate ad aumento di biodiversità microbica. Ricchezza batterica/fungina aumentata con >3 piante | Dockx et al., 2022 [99] |
| 176 Salotti (Belgio) | | Impatto di spazio verde esterno sul microbioma indoor | NGS (16S rRNA/ITS); qPCR | <ul style="list-style-type: none"> Verde abitativo associato a una maggiore biodiversità microbica | Dockx et al., 2021 [100] |
| Uffici (Finlanda) | | Impatto del verde verticale sul microbiota della pelle e sull'immunità | NGS (16S rRNA) | <ul style="list-style-type: none"> Le pareti verdi a circolazione d'aria possono migliorare la salute della pelle e la risposta immunitaria | Soininen et al., 2022 [101] |
| Scuole (Svezia) | secondarie | Impatto delle piante sul microbioma indoor | Misurazione di parametri fisici interni (sensori) | <ul style="list-style-type: none"> Piante interne associate a calo della CO₂ (-10%) e a temperature più stabili | Danielski et al., 2022 [102] |
| Scuole | | Review sulla qualità dell'aria indoor e sulla salute | Correlazione tra ventilazione, CO ₂ , e conte CFU | <ul style="list-style-type: none"> Patogeni batterici/fungini nell'aria delle aule scolastiche Ventilazione inadeguata riduce la qualità dell'aria (CO₂ e bioburden). | Daisey et al., 2003 [103] |
| Scuole superiori (Italia) | | Monitoraggio ambientale microbico | Misurazione di CO ₂ e conte CFU nell'aria | <ul style="list-style-type: none"> <i>Staphylococcus</i> spp. e altri patogeni rilevati nell'aria indoor Ventilazione inadeguata influisce sulla qualità dell'aria (CO₂). | Langiano et al., 2024 [104] |

I nostri dati mostrano che diversi tipi di interventi sostenibili possono essere compatibili tra loro e contribuire a ottenere risultati additivi, superiori a quelli raggiungibili applicando interventi separati. Un intervento combinato comprendente piante, ventilazione meccanica e sanificazione probiotica potrebbe quindi essere altamente efficace nel ridurre la carica microbica indoor e la resistenza antimicrobica (AMR), suggerendo che un approccio integrato non solo potrebbe aiutare a ridurre tutti i patogeni persistenti, ma anche avere un impatto diretto nel limitare la presenza e la diffusione di microrganismi antibiotico-resistenti in questi ambienti, aspetto particolarmente rilevante negli spazi pubblici, dove l'esposizione a ceppi resistenti può rappresentare un serio rischio per la salute delle popolazioni vulnerabili, come gli studenti. Questo studio è stato inizialmente progettato come "proof of concept" e presenta alcune limitazioni che attualmente non consentono un'elevata generalizzabilità dei risultati raccolti, tra cui: (1) la dimensione del campione: questo studio interventistico è stato condotto in un'unica scuola, e i risultati dovrebbero essere confermati in altri istituti con ubicazioni geografiche, tipologie edilizie, sistemi di ventilazione, condizioni

stagionali e popolazioni studentesche diverse; (2) la breve durata dei periodi di studio, in particolare le fasi T1 (solo piante) e T2 (ventilazione meccanica), poiché tale durata limitata potrebbe non essere stata sufficiente a osservare pienamente gli effetti a lungo termine e la stabilizzazione della comunità microbica dopo questi interventi specifici. La breve durata delle fasi T1 e T2 è stata principalmente dettata da esigenze logistiche legate allo sviluppo del progetto PCTO entro i limiti temporali scolastici, con la consapevolezza che un'estensione dei periodi d'intervento potrebbe fornire dati più solidi; (3) il tipo di analisi: sono stati utilizzati il conteggio CFU e il qPCR microarray con l'obiettivo di rilevare eventuali cambiamenti nella quantità di patogeni e ARGs, ma un'analisi più completa dell'intero microbioma, eseguita mediante NGS o WGS, sarebbe importante per profilare l'intera popolazione microbica e valutarne caratteristiche come la biodiversità. Le tecniche di sequenziamento ad alta resa permetterebbero infatti di superare i limiti legati all'uso di tecniche basate sulla coltura, fornendo un quadro completo del microbioma scolastico indoor, che potrebbe rafforzare e confermare i nostri dati, essere utile nel confronto con studi di caso pubblicati e permettere conclusioni meno speculative. Gli studi sul microbioma indoor possono infatti fornire un'identificazione precisa di target legati alla salute e contribuire all'ottimizzazione delle pratiche standard.

5. Conclusioni

Il presente studio rappresenta una parte di un progetto di Percorsi per le Competenze Trasversali e l'Orientamento (PCTO) incentrato sulla sostenibilità, realizzato con studenti di un liceo italiano. Nonostante le limitazioni dello studio (monocentrico, durata limitata, assenza di analisi NGS), i risultati raccolti dimostrano che una strategia combinata volta al miglioramento del microbioma indoor potrebbe essere efficace nel controllare la contaminazione da patogeni, la diffusione della AMR e i parametri ambientali (CO₂, temperatura, umidità) negli spazi scolastici. Gli interventi sostenibili adottati nell'aula test includevano l'introduzione di piante, ventilazione meccanica e sanificazione probiotica, ed hanno complessivamente evidenziato una modifica significativa del microbioma delle superfici e dell'aria indoor, che potrebbe favorire un ambiente più sano per studenti e personale. I dati suggeriscono complessivamente che l'uso di un approccio olistico che tenga conto di tutti i parametri che influenzano la qualità degli spazi interni possa ridurre in modo sostenibile ed efficace il rischio infettivo per gli occupanti e la diffusione della AMR, tutelando allo stesso tempo la salute dell'ambiente esterno, in linea con i principi della One Health. Ulteriori ricerche basate su campioni più ampi, includendo tipologie di edifici scolastici e ubicazioni geografiche diversificate, oltre all'impiego di metodologie differenti (inclusi metodi di sequenziamento profondo), potrebbero contribuire a una migliore comprensione delle dinamiche microbiche all'interno dell'ambiente scolastico.

Contributi degli autori: Concettualizzazione, S.M. ed E.C.; metodologia, S.M. ed E.C.; validazione, S.M. ed E.C.; analisi formale, M.D.; indagini, M.D., I.S., E.M., F.B., M.B. e A.V.; risorse, S.M. ed E.C.; cura dei dati, M.D.; redazione—stesura originale, M.D.; redazione—revisione e modifica, E.C.; visualizzazione, I.S.; supervisione, E.C.; gestione del progetto, S.M.; finanziamento, S.M. ed E.C. Tutti gli autori hanno letto e approvato la versione pubblicata del manoscritto.

Finanziamento: La ricerca è stata sostenuta principalmente da fondi interni del CIAS.

Parere del comitato etico: Non applicabile.

Consenso informato: Non applicabile.

Dichiarazione sulla disponibilità dei dati: I contributi originali presentati nello studio sono inclusi nell'articolo. Ulteriori richieste possono essere rivolte agli autori corrispondenti.

Ringraziamenti: Si ringraziano tutte le persone coinvolte nello sviluppo del progetto PCTO, in particolare, Liceo Ariosto: Isabella Fedozzi, Stefania Borini, and Giuseppina Favaron; the teachers of Liceo Ariosto: Anna Maria Masi, Cristina Di Bona, Mauro Ferrari, Tiziana Gallani, and Girolamo De Michele; gli studenti della classe IV N: Virginia Balboni, Anna Battaglini, Anna Bovolenta, Claudia Franceschini, Martina Grossi, Alice Maietti, Andrea Malacarne, Michela Palomba, Sofia Righetto, Caterina Rubini, Giacomo Soffritti, Alice Spolverini, Giacomo Vargiu, Fabio Violi, Matteo Vitadello, Lucrezia Travagli, and Francesca Trevisanut; lo staff del Liceo Ariosto: Marco Prandini, Lucia Miele, Nicoletta Faccioli, Cosima Alberani, Oriana Storari, GianLuca Magnani, Clara Baroni, i tecnici informatici Lorenzo Droghetti e Mauro Barbanti; Università di Ferrara: Luca Antonucci, Giovanni Ganino, Serena Querzoli, Renato Gerdol, Fausto Molinari, Laura Brancaleoni, Luca Tebaldi, Sara Guberti, e Andrea Trevisani; il Dipartimento di Architettura dell'Università di Ferrara: Francesco Axel Romio, e Francesco Brandi; e le autorità del Comune e della Provincia di Ferrara: Alessandro Balboni, Daniele Garuti, Luca Capozzi, Stefano Bottoni, e Gabriella Ferroni.

Conflitti di interesse: Gli autori dichiarano di non avere conflitti di interesse.

Riferimenti bibliografici

1. *Microbiomes of the Built Environment*; National Academies Press: Washington, DC, USA, 2017; ISBN 978-0-309-44980-9.
2. Fu, X.; Ou, Z.; Zhang, M.; Meng, Y.; Li, Y.; Wen, J.; Hu, Q.; Zhang, X.; Norbäck, D.; Deng, Y.; et al. Indoor Bacterial, Fungal and Viral Species and Functional Genes in Urban and Rural Schools in Shanxi Province, China—Association with Asthma, Rhinitis and Rhinoconjunctivitis in High School Students. *Microbiome* **2021**, *9*, 138. <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01091-0>.
3. Fu, X.; Ou, Z.; Sun, Y. Indoor Microbiome and Allergic Diseases: From Theoretical Advances to Prevention Strategies. *Eco-Environ. Health* **2022**, *1*, 133–146. <https://doi.org/10.1016/j.eehl.2022.09.002>.
4. Li, S.; Yang, Z.; Hu, D.; Cao, L.; He, Q. Understanding Building–Occupant–Microbiome Interactions toward Healthy Built Environments: A Review. *Front. Environ. Sci. Eng.* **2021**, *15*, 65. <https://doi.org/10.1007/s11783-020-1357-3>.
5. Sun, Y.; Meng, Y.; Ou, Z.; Li, Y.; Zhang, M.; Chen, Y.; Zhang, Z.; Chen, X.; Mu, P.; Norbäck, D.; et al. Indoor Microbiome, Air Pollutants and Asthma, Rhinitis and Eczema in Preschool Children—A Repeated Cross-Sectional Study. *Environ. Int.* **2022**, *161*, 107137. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107137>.
6. Hospodsky, D.; Qian, J.; Nazaroff, W.W.; Yamamoto, N.; Bibby, K.; Rismani-Yazdi, H.; Peccia, J. Human Occupancy as a Source of Indoor Airborne Bacteria. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e34867. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034867>.
7. Meadow, J.F.; Altrichter, A.E.; Kembel, S.W.; Moriyama, M.; O'Connor, T.K.; Womack, A.M.; Brown, G.Z.; Green, J.L.; Bohannan, B.J.M. Bacterial Communities on Classroom Surfaces Vary with Human Contact. *Microbiome* **2014**, *2*, 7. <https://doi.org/10.1186/2049-2618-2-7>.
8. Meadow, J.F.; Altrichter, A.E.; Kembel, S.W.; Kline, J.; Mhuireach, G.; Moriyama, M.; Northcutt, D.; O'Connor, T.K.; Womack, A.M.; Brown, G.Z.; et al. Indoor Airborne Bacterial Communities Are Influenced by Ventilation, Occupancy, and Outdoor Air Source. *Indoor Air* **2014**, *24*, 41–48. <https://doi.org/10.1111/ina.12047>.
9. Kembel, S.W.; Jones, E.; Kline, J.; Northcutt, D.; Stenson, J.; Womack, A.M.; Bohannan, B.J.M.; Brown, G.Z.; Green, J.L. Architectural Design Influences the Diversity and Structure of the Built Environment Microbiome. *ISME J.* **2012**, *6*, 1469–1479. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.211>.
10. Täubel, M.; Castagnoli, E.; Salthammer, T.; Morawska, L.; Salonen, H. The Impact of Cleaning on the Microbiomes of Indoor Surfaces. *Indoor Environ.* **2024**, *1*, 100021. <https://doi.org/10.1016/j.indenv.2024.100021>.
11. Esty, B.; Phipatanakul, W. School Exposure and Asthma. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* **2018**, *120*, 482–487. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2018.01.028>.
12. Ketema, R.M.; Araki, A.; Ait Bamai, Y.; Saito, T.; Kishi, R. Lifestyle Behaviors and Home and School Environment in Association with Sick Building Syndrome among Elementary School Children: A Cross-Sectional Study. *Environ. Health Prev. Med.* **2020**, *25*, 28. <https://doi.org/10.1186/s12199-020-00869-2>.
13. Fu, X.; Norbäck, D.; Yuan, Q.; Li, Y.; Zhu, X.; Hashim, J.H.; Hashim, Z.; Ali, F.; Zheng, Y.-W.; Lai, X.-X.; et al. Indoor Microbiome, Environmental Characteristics and Asthma among Junior High School Students in Johor Bahru, Malaysia. *Environ. Int.* **2020**, *138*, 105664. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105664>.
14. Ferrari, S.; Blázquez, T.; Cardelli, R.; De Angelis, E.; Puglisi, G.; Escandón, R.; Suárez, R. Air Change Rates and Infection Risk in School Environments: Monitoring Naturally Ventilated Classrooms in a Northern Italian Urban Context. *Heliyon* **2023**, *9*, e19120. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e19120>.
15. European Commission, Joint Research Centre: Directorate-General for Health and Consumers, Institute for Health and Consumer Protection. Csobod, E., Annesi-Maesano, I., Carrer, P., Kephelopoulos, S., Madureira, J., Rudnai, P., De Oliveira Fernandes, E., Barrero, J., Beregszászi, T., Hyvarinen A. et al. . *SINPHONIE—Schools Indoor Pollution & Health Observatory Network in Europe—Final Report*; EUR 26738, Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2014.
16. Chiesa, G.; Vigliotti, M. Comparing Mechanical Ventilation Control Strategies for Indoor Air Quality: Monitoring and Simulation Results of a School Building in Northern Italy. *Energy Build.* **2024**, *322*, 114665. <https://doi.org/10.1016/j.enbuild.2024.114665>.
17. Verdier, T.; Coutand, M.; Bertron, A.; Roques, C. A Review of Indoor Microbial Growth across Building Materials and Sampling and Analysis Methods. *Build. Environ.* **2014**, *80*, 136–149. <https://doi.org/10.1016/j.buildenv.2014.05.030>.
18. Adams, R.I.; Leppänen, H.; Karvonen, A.M.; Jacobs, J.; Borràs-Santos, A.; Valkonen, M.; Krop, E.; Haverinen-Shaughnessy, U.; Huttunen, K.; Zock, J.; et al. Microbial Exposures in Moisture-damaged Schools and Associations with Respiratory Symptoms in Students: A Multi-country Environmental Exposure Study. *Indoor Air* **2021**, *31*, 1952–1966. <https://doi.org/10.1111/ina.12865>.
19. Gunn, C.; Vahdati, M.; Shahrestani, M. Green Walls in Schools—The Potential Well-Being Benefits. *Build. Environ.* **2022**, *224*, 109560. <https://doi.org/10.1016/j.buildenv.2022.109560>.
20. Mahnert, A.; Moissl-Eichinger, C.; Berg, G. Microbiome Interplay: Plants Alter Microbial Abundance and Diversity within the Built Environment. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 887. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00887>.

21. Chiesi, L.; Costa, P.; Ciaravella, F.; Galmarini, B. Re-Naturalizing the Built Environment. Plants, Architecture, and Pedagogy in Contemporary Green Schools. *Front. Sustain. Cities* **2024**, *6*, 1397159. <https://doi.org/10.3389/frsc.2024.1397159>.
22. Pichlhöfer, A.; Sesto, E.; Hollands, J.; Korjenic, A. Health-Related Benefits of Different Indoor Plant Species in a School Setting. *Sustainability* **2021**, *13*, 9566. <https://doi.org/10.3390/su13179566>.
23. Shaughnessy, R.; Hernandez, M.; Haverinen-Shaughnessy, U. Effects of Classroom Cleaning on Student Health: A Longitudinal Study. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* **2022**, *32*, 767–773. <https://doi.org/10.1038/s41370-022-00427-8>.
24. Lindenmayer, J.M.; Schoenfeld, S.; O’Grady, R.; Carney, J.K. Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus in a High School Wrestling Team and the Surrounding Community. *Arch. Intern. Med.* **1998**, *158*, 895. <https://doi.org/10.1001/archinte.158.8.895>.
25. Ababneh, Q.; Jaradat, Z.; Khanfar, M.; Alnohoud, R.; Alzu’bi, M.; Makahleh, S.; Abulaila, S. Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Contamination of High-Touched Surfaces in a University Campus. *J. Appl. Microbiol.* **2022**, *132*, 4486–4500. <https://doi.org/10.1111/jam.15526>.
26. van Tonder, A.J.; McCullagh, F.; McKeand, H.; Thaw, S.; Bellis, K.; Raisen, C.; Lay, L.; Aggarwal, D.; Holmes, M.; Parkhill, J.; et al. Colonization and Transmission of Staphylococcus Aureus in Schools: A Citizen Science Project. *Microb. Genom.* **2023**, *9*, 000993. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000993>.
27. Vandini, A.; Temmerman, R.; Frabetti, A.; Caselli, E.; Antonioli, P.; Balboni, P.G.; Platano, D.; Branchini, A.; Mazzacane, S. Hard Surface Biocontrol in Hospitals Using Microbial-Based Cleaning Products. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e108598. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108598>.
28. Parveen, N.; Chowdhury, S.; Goel, S. Environmental Impacts of the Widespread Use of Chlorine-Based Disinfectants during the COVID-19 Pandemic. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2022**, *29*, 85742–85760. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-18316-2>.
29. Al-Ghalith, G.A.; Knights, D. Bygiene: The New Paradigm of Bidirectional Hygiene. *Yale J. Biol. Med.* **2015**, *88*, 359–365.
30. Al-Marzooq, F.; Al Bayat, S.; Sayyar, F.; Ishaq, H.; Nasralla, H.; Koutaich, R.; Kawas, S. Al Can Probiotic Cleaning Solutions Replace Chemical Disinfectants in Dental Clinics? *Eur. J. Dent.* **2018**, *12*, 532–539. https://doi.org/10.4103/ejd.ejd_124_18.
31. Klassert, T.E.; Zubiria-Barrera, C.; Neubert, R.; Stock, M.; Schneegans, A.; López, M.; Driesch, D.; Zakonsky, G.; Gastmeier, P.; Slevogt, H.; et al. Comparative Analysis of Surface Sanitization Protocols on the Bacterial Community Structures in the Hospital Environment. *Clin. Microbiol. Infect.* **2022**, *28*, 1105–1112. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2022.02.032>.
32. Afinogenova, A.G.; Kraeva, L.A.; Afinogenov, G.E.; Veretennikov, V.V. Probiotic-Based Sanitation as Alternatives to Chemical Disinfectants. *Russ. J. Infect. Immun.* **2018**, *7*, 419–424. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2017-4-419-424>.
33. Kleintjes, W.G.; Prag, R.; Ebrahim, M.; Kotzee, E.P. The Effect of Probiotics for Environmental Cleaning on Hospital-Acquired Infection in a Burn Centre: The Results of a Non-Randomised Controlled Prospective Study. *S. Afr. J. Plast. Reconstr. Aesthetic Surg. Burn.* **2020**, *3*, 33. <https://doi.org/10.7196/SAJPRASB.2020.v3i2.42>.
34. Caselli, E.; Brusaferrero, S.; Coccagna, M.; Arnoldo, L.; Berloco, F.; Antonioli, P.; Tarricone, R.; Pelissero, G.; Nola, S.; La Fauci, V.; et al. Reducing Healthcare-Associated Infections Incidence by a Probiotic-Based Sanitation System: A Multicentre, Prospective, Intervention Study. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0199616. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199616>.
35. D’Accolti, M.; Soffritti, I.; Bini, F.; Mazziga, E.; Cason, C.; Comar, M.; Volta, A.; Bisi, M.; Fumagalli, D.; Mazzacane, S.; et al. Shaping the Subway Microbiome through Probiotic-Based Sanitation during the COVID-19 Emergency: A Pre–Post Case–Control Study. *Microbiome* **2023**, *11*, 64. <https://doi.org/10.1186/s40168-023-01512-2>.
36. Caselli, E.; Arnoldo, L.; Rognoni, C.; D’Accolti, M.; Soffritti, I.; Lanzoni, L.; Bisi, M.; Volta, A.; Tarricone, R.; Brusaferrero, S.; et al. Impact of a Probiotic-Based Hospital Sanitation on Antimicrobial Resistance and HAI-Associated Antimicrobial Consumption and Costs: A Multicenter Study. *Infect. Drug Resist.* **2019**, *12*, 501–510. <https://doi.org/10.2147/IDR.S194670>.
37. Caselli, E.; D’Accolti, M.; Soffritti, I.; Lanzoni, L.; Bisi, M.; Volta, A.; Berloco, F.; Mazzacane, S. An Innovative Strategy for the Effective Reduction of MDR Pathogens from the Nosocomial Environment. In *Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health; Advance in Experimental Medicine and Biology* ; 2019,; 1249, 79–91. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/5584_2019_399
38. Caselli, E.; D’Accolti, M.; Soffritti, I.; Piffanelli, M.; Mazzacane, S. Spread of Mcr-1-Driven Colistin Resistance on Hospital Surfaces, Italy. *Emerg. Infect. Dis.* **2018**, *24*, 1752–1753. <https://doi.org/10.3201/eid2409.171386>.
39. Caselli, E.; D’Accolti, M.; Vandini, A.; Lanzoni, L.; Camerada, M.T.; Coccagna, M.; Branchini, A.; Antonioli, P.; Balboni, P.G.; Di Luca, D.; et al. Impact of a Probiotic-Based Cleaning Intervention on the Microbiota Ecosystem of the Hospital Surfaces: Focus on the Resistome Remodulation. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0148857. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148857>.
40. Cason, C.; D’Accolti, M.; Campisciano, G.; Soffritti, I.; Ponis, G.; Mazzacane, S.; Maggiore, A.; Risso, F.M.; Comar, M.; Caselli, E. Microbial Contamination in Hospital Environment Has the Potential to Colonize Preterm Newborns’ Nasal Cavities. *Pathogens* **2021**, *10*, 615. <https://doi.org/10.3390/pathogens10050615>.

41. Cason, C.; D'Accolti, M.; Soffritti, I.; Mazzacane, S.; Comar, M.; Caselli, E. Next-Generation Sequencing and PCR Technologies in Monitoring the Hospital Microbiome and Its Drug Resistance. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 969863. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.969863>.
42. D'Accolti, M.; Soffritti, I.; Bini, F.; Mazziga, E.; Mazzacane, S.; Caselli, E. Pathogen Control in the Built Environment: A Probiotic-Based System as a Remedy for the Spread of Antibiotic Resistance. *Microorganisms* **2022**, *10*, 225. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020225>.
43. D'Accolti, M.; Soffritti, I.; Mazzacane, S.; Caselli, E. Fighting AMR in the Healthcare Environment: Microbiome-Based Sanitation Approaches and Monitoring Tools. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1535. <https://doi.org/10.3390/ijms20071535>.
44. Hollingshead, S.; Vapnek, D. Nucleotide Sequence Analysis of a Gene Encoding a Streptomycin/Spectinomycin Adenyltransferase. *Plasmid* **1985**, *13*, 17–30. [https://doi.org/10.1016/0147-619X\(85\)90052-6](https://doi.org/10.1016/0147-619X(85)90052-6).
45. Aris, P.; Boroumand, M.A.; Douraghi, M. Amikacin Resistance Due to the AphA6 Gene in Multi-Antibiotic Resistant Acinetobacter Baumannii Isolates Belonging to Global Clone 1 from Iran. *BMC Microbiol.* **2019**, *19*, 221. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1592-6>.
46. Sun, Y.; Zeng, Z.; Chen, S.; Ma, J.; He, L.; Liu, Y.; Deng, Y.; Lei, T.; Zhao, J.; Liu, J.-H. High Prevalence of BlaCTX-M Extended-Spectrum β -Lactamase Genes in Escherichia Coli Isolates from Pets and Emergence of CTX-M-64 in China. *Clin. Microbiol. Infect.* **2010**, *16*, 1475–1481. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03127.x>.
47. Lee, S.H.; Jeong, S.H. Nomenclature of GES-Type Extended-Spectrum β -Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 2148–2150. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.5.2148-2150.2005>.
48. Walther-Rasmussen, J.; Høiby, N. Class A Carbapenemases. *J. Antimicrob. Chemother.* **2007**, *60*, 470–482. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm226>.
49. Matsumoto, Y.; Inoue, M. Characterization of SFO-1, a Plasmid-Mediated Inducible Class A β -Lactamase from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*, 307–313. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.2.307>.
50. Aly, M.M.; Abu Alsoud, N.M.; Elroh, M.S.; Al Johani, S.M.; Balkhy, H.H. High Prevalence of the PER-1 Gene among Carbapenem-Resistant Acinetobacter Baumannii in Riyadh, Saudi Arabia. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2016**, *35*, 1759–1766. <https://doi.org/10.1007/s10096-016-2723-8>.
51. Toleman, M.A.; Rolston, K.; Jones, R.N.; Walsh, T.R. VIM-7, an Evolutionarily Distinct Metallo- β -Lactamase Gene in a Pseudomonas Aeruginosa Isolate from the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 329–332. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.1.329-332.2004>.
52. Brízio, A.; Conceição, T.; Pimentel, M.; Da Silva, G.; Duarte, A. High-Level Expression of IMP-5 Carbapenemase Owing to Point Mutation in the -35 Promoter Region of Class 1 Integron among Pseudomonas Aeruginosa Clinical Isolates. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2006**, *27*, 27–31. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.08.023>.
53. Guan, L.; Beig, M.; Wang, L.; Navidifar, T.; Moradi, S.; Motallebi Tabaei, F.; Teymouri, Z.; Abedi Moghadam, M.; Sedighi, M. Global Status of Antimicrobial Resistance in Clinical Enterococcus Faecalis Isolates: Systematic Review and Meta-Analysis. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **2024**, *23*, 80. <https://doi.org/10.1186/s12941-024-00728-w>.
54. Gonzalez Leiza, M.; Perez-Diaz, J.C.; Ayala, J.; Casellas, J.M.; Martinez-Beltran, J.; Bush, K.; Baquero, F. Gene Sequence and Biochemical Characterization of FOX-1 from Klebsiella Pneumoniae, a New AmpC-Type Plasmid-Mediated Beta-Lactamase with Two Molecular Variants. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1994**, *38*, 2150–2157. <https://doi.org/10.1128/AAC.38.9.2150>.
55. Tzouveleki, L.S.; Tzelepi, E.; Mentis, A.F. Nucleotide Sequence of a Plasmid-Mediated Cephalosporinase Gene (BlaLAT-1) Found in Klebsiella Pneumoniae. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1994**, *38*, 2207–2209. <https://doi.org/10.1128/AAC.38.9.2207>.
56. Papanicolaou, G.A.; Medeiros, A.A.; Jacoby, G.A. Novel Plasmid-Mediated Beta-Lactamase (MIR-1) Conferring Resistance to Oxymino- and Alpha-Methoxy Beta-Lactams in Clinical Isolates of Klebsiella Pneumoniae. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1990**, *34*, 2200–2209. <https://doi.org/10.1128/AAC.34.11.2200>.
57. Oguri, T.; Furuyama, T.; Okuno, T.; Ishii, Y.; Tateda, K.; Bonomo, R.A.; Shimizu-Ibuka, A. Crystal Structure of Mox-1, a Unique Plasmid-Mediated Class C β -Lactamase with Hydrolytic Activity towards Moxalactam. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 3914–3920. <https://doi.org/10.1128/AAC.02363-13>.
58. Bhattacharjee, A.; Maurya, A.; Talukdar, A.; Dhar (Chanda), D.; Chakravarty, A. Genetic Environment of OXA-2 Beta-Lactamase Producing Gram-Negative Bacilli from a Tertiary Referral Hospital. *Indian J. Med. Res.* **2015**, *141*, 368. <https://doi.org/10.4103/0971-5916.156584>.
59. Smith, C.A.; Antunes, N.T.; Stewart, N.K.; Toth, M.; Kumarasiri, M.; Chang, M.; Mobashery, S.; Vakulenko, S.B. Structural Basis for Carbapenemase Activity of the OXA-23 β -Lactamase from Acinetobacter Baumannii. *Chem. Biol.* **2013**, *20*, 1107–1115. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.07.015>.

60. Héritier, C.; Poirel, L.; Nordmann, P. Genetic and Biochemical Characterization of a Chromosome-Encoded Carbapenem-Hydrolyzing Ambler Class D β -Lactamase from *Shewanella* Algae. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 1670–1675. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.5.1670-1675.2004>.
61. Rezazadeh, M.; Baghchesaraei, H.; Peymani, A. Plasmid-Mediated Quinolone-Resistance (Qnr) Genes in Clinical Isolates of *Escherichia Coli* Collected from Several Hospitals of Qazvin and Zanjan Provinces, Iran. *Osong Public Health Res. Perspect.* **2016**, *7*, 307–312. <https://doi.org/10.1016/j.phrp.2016.08.003>.
62. Malhotra-Kumar, S.; Mazzariol, A.; Van Heirstraeten, L.; Lammens, C.; de Rijk, P.; Cornaglia, G.; Goossens, H. Unusual Resistance Patterns in Macrolide-Resistant *Streptococcus Pyogenes* Harbouring Erm(A). *J. Antimicrob. Chemother.* **2009**, *63*, 42–46. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn432>.
63. Min, Y.-H.; Kwon, A.-R.; Yoon, E.-J.; Shim, M.-J.; Choi, E.-C. Translational Attenuation and mRNA Stabilization as Mechanisms of Erm (B) Induction by Erythromycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, *52*, 1782–1789. <https://doi.org/10.1128/AAC.01376-07>.
64. Shivakumar, A.G.; Dubnau, D. Characterization of a Plasmid-Specified Ribosome Methylase Associated with Macrolide Resistance. *Nucleic Acids Res.* **1981**, *9*, 2549–2562. <https://doi.org/10.1093/nar/9.11.2549>.
65. Daly, M.M.; Doktor, S.; Flamm, R.; Shortridge, D. Characterization and Prevalence of MefA, MefE, and the Associated Msr (D) Gene in *Streptococcus Pneumoniae* Clinical Isolates. *J. Clin. Microbiol.* **2004**, *42*, 3570–3574. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.8.3570-3574.2004>.
66. Poole, K. Efflux-Mediated Antimicrobial Resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **2005**, *56*, 20–51. <https://doi.org/10.1093/jac/dki171>.
67. Warburton, P.J.; Ciric, L.; Lerner, A.; Seville, L.A.; Roberts, A.P.; Mullany, P.; Allan, E. TetAB(46), a Predicted Heterodimeric ABC Transporter Conferring Tetracycline Resistance in *Streptococcus Australis* Isolated from the Oral Cavity. *J. Antimicrob. Chemother.* **2013**, *68*, 17–22. <https://doi.org/10.1093/jac/dks351>.
68. Utsui, Y.; Yokota, T. Role of an Altered Penicillin-Binding Protein in Methicillin- and Cephem-Resistant *Staphylococcus Aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1985**, *28*, 397–403. <https://doi.org/10.1128/AAC.28.3.397>.
69. Stabile, L.; Dell’Isola, M.; Russi, A.; Massimo, A.; Buonanno, G. The Effect of Natural Ventilation Strategy on Indoor Air Quality in Schools. *Sci. Total Environ.* **2017**, *595*, 894–902. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.048>.
70. Bringslimark, T.; Hartig, T.; Patil, G.G. Psychological Benefits of Indoor Plants in Workplaces: Putting Experimental Results into Context. *HortScience* **2007**, *42*, 581–587. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.42.3.581>.
71. Pegas, P.N.; Alves, C.A.; Nunes, T.; Bate-Epey, E.F.; Evtugina, M.; Pio, C.A. Could Houseplants Improve Indoor Air Quality in Schools? *J. Toxicol. Environ. Health A* **2012**, *75*, 1371–1380. <https://doi.org/10.1080/15287394.2012.721169>.
72. Nabi, G.; Wang, Y.; Hao, Y.; Khan, S.; Wu, Y.; Li, D. Massive Use of Disinfectants against COVID-19 Poses Potential Risks to Urban Wildlife. *Environ. Res.* **2020**, *188*, 109916. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109916>.
73. Zeshan, B.; Karobari, M.I.; Afzal, N.; Siddiq, A.; Basha, S.; Basheer, S.N.; Peeran, S.W.; Mustafa, M.; Daud, N.H.A.; Ahmed, N.; et al. The Usage of Antibiotics by COVID-19 Patients with Comorbidities: The Risk of Increased Antimicrobial Resistance. *Antibiotics* **2021**, *11*, 35. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11010035>.
74. Kampf, G. Biocidal Agents Used for Disinfection Can Enhance Antibiotic Resistance in Gram-Negative Species. *Antibiotics* **2018**, *7*, 110. <https://doi.org/10.3390/antibiotics7040110>.
75. D’Accolti, M.; Soffritti, I.; Bini, F.; Mazziga, E.; Arnoldo, L.; Volta, A.; Bisi, M.; Antonioli, P.; Laurenti, P.; Ricciardi, W.; et al. Potential Use of a Combined Bacteriophage–Probiotic Sanitation System to Control Microbial Contamination and AMR in Healthcare Settings: A Pre-Post Intervention Study. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 6535. <https://doi.org/10.3390/ijms24076535>.
76. Park, J.-H.; Lemons, A.R.; Roseman, J.; Green, B.J.; Cox-Ganser, J.M. Bacterial Community Assemblages in Classroom Floor Dust of 50 Public Schools in a Large City: Characterization Using 16S rRNA Sequences and Associations with Environmental Factors. *Microbiome* **2021**, *9*, 15. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00954-2>.
77. Yang, J.I.L.; Lee, B.G.; Park, J.-H.; Yeo, M.-K. Airborne Fungal and Bacterial Microbiome in Classrooms of Elementary Schools during the COVID-19 Pandemic Period: Effects of School Disinfection and Other Environmental Factors. *Indoor Air* **2022**, *32*, e13107. <https://doi.org/10.1111/ina.13107>.
78. Mousavi, B.; Hedayati, M.T.; Hedayati, N.; Ilkit, M.; Syedmousavi, S. *Aspergillus* Species in Indoor Environments and Their Possible Occupational and Public Health Hazards. *Curr. Med. Mycol.* **2016**, *2*, 36–42. <https://doi.org/10.18869/acadpub.cmm.2.1.36>.
79. Salonen, H.; Duchaine, C.; Mazaheri, M.; Clifford, S.; Lappalainen, S.; Reijula, K.; Morawska, L. Airborne Viable Fungi in School Environments in Different Climatic Regions—A Review. *Atmos. Environ.* **2015**, *104*, 186–194. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2015.01.012>.

80. Sadrizadeh, S.; Yao, R.; Yuan, F.; Awbi, H.; Bahnfleth, W.; Bi, Y.; Cao, G.; Croitoru, C.; de Dear, R.; Haghighat, F.; et al. Indoor Air Quality and Health in Schools: A Critical Review for Developing the Roadmap for the Future School Environment. *J. Build. Eng.* **2022**, *57*, 104908. <https://doi.org/10.1016/j.jobe.2022.104908>.
81. Song, Z.; Chen, L.; Sun, S.; Yang, G.; Yu, G. Unveiling the Airborne Microbial Menace: Novel Insights into Pathogenic Bacteria and Fungi in Bioaerosols from Nursery Schools to Universities. *Sci. Total Environ.* **2024**, *929*, 172694. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.172694>.
82. Prussin, A.J.; Marr, L.C. Sources of Airborne Microorganisms in the Built Environment. *Microbiome* **2015**, *3*, 78. <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0144-z>.
83. Gilbert, J.A.; Stephens, B. Microbiology of the Built Environment. *Nat. Rev. Microbiol.* **2018**, *16*, 661–670. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0065-5>.
84. Votintseva, A.A.; Fung, R.; Miller, R.R.; Knox, K.; Godwin, H.; Wyllie, D.H.; Bowden, R.; Crook, D.W.; Walker, A.S. Prevalence of Staphylococcus Aureus Protein A (Spa) Mutants in the Community and Hospitals in Oxfordshire. *BMC Microbiol.* **2014**, *14*, 63. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-63>.
85. Stanforth, B.; Krause, A.; Starkey, C.; Ryan, T.J. Prevalence of Community-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus in High School Wrestling Environments. *J. Environ. Health* **2010**, *72*, 12–16.
86. Małecka-Adamowicz, M.; Koim-Puchowska, B.; Dembowska, E.A. Diversity of Bioaerosols in Selected Rooms of Two Schools and Antibiotic Resistance of Isolated Staphylococcal Strains (Bydgoszcz, Poland): A Case Study. *Atmosphere* **2020**, *11*, 1105. <https://doi.org/10.3390/atmos11101105>.
87. Wang, Y.; Lin, J.; Zhang, T.; He, S.; Li, Y.; Zhang, W.; Ye, X.; Yao, Z. Environmental Contamination Prevalence, Antimicrobial Resistance and Molecular Characteristics of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus and Staphylococcus Epidermidis Isolated from Secondary Schools in Guangzhou, China. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2020**, *17*, 623. <https://doi.org/10.3390/ijerph17020623>.
88. Portnoy, J.M.; Kwak, K.; Dowling, P.; VanOsdol, T.; Barnes, C. Health Effects of Indoor Fungi. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* **2005**, *94*, 313–320. [https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)60982-9](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)60982-9).
89. Mahnert, A.; Haratani, M.; Schmuck, M.; Berg, G. Enriching Beneficial Microbial Diversity of Indoor Plants and Their Surrounding Built Environment with Biostimulants. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2985. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02985>.
90. Niza, I.L.; Bueno, A.M.; Gameiro da Silva, M.; Broday, E.E. Air Quality and Ventilation: Exploring Solutions for Healthy and Sustainable Urban Environments in Times of Climate Change. *Results Eng.* **2024**, *24*, 103157. <https://doi.org/10.1016/j.rineng.2024.103157>.
91. Ballerini, V.; Coccagna, M.; Volta, A.; Droghetti, L.; Rossi di Schio, E.; Valdiserri, P.; Mazzacane, S. The Role of Mechanical Ventilation on Indoor Air Quality in Schools: An Experimental Comprehensive Analysis. *Buildings* **2025**, *15*, 869. <https://doi.org/10.3390/buildings15060869>.
92. BS EN 16798-1:2019; Energy Performance of Buildings – Ventilation for Buildings – Part 1: Indoor Environmental Input Parameters for Design and Assessment of Energy Performance of Buildings Addressing Indoor Air Quality, Thermal Environment, Lighting and Acoustics. British Standards Institution: London, UK, 2019.
93. Caselli, E. Hygiene: Microbial Strategies to Reduce Pathogens and Drug Resistance in Clinical Settings. *Microb. Biotechnol.* **2017**, *10*, 1079–1083. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12755>.
94. Urdaci, M.C.; Pinchuk, I. V Antimicrobial Activity of Bacillus Probiotics. In *Bacterial Spore Formers—Probiotics and Emerging Applications*; 2004; pp. 1–12; available online: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20043171459> (access on 25 February 2025)
95. Zhang, M.; Tang, H.; Chen, Y.; Chen, Z.; Xu, Y.; Fu, X.; Sun, Y.; Zhao, Z. Impact of Environmental Characteristics on Children’s Gut Microbiota—A Pilot Study in Assessing the Role of Indoor Microbiome and Metabolites. *Environ. Res.* **2023**, *234*, 116114. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.116114>.
96. Lee, B.G.; Yang, J.I.; Kim, E.; Geum, S.W.; Park, J.; Yeo, M. Investigation of Bacterial and Fungal Communities in Indoor and Outdoor Air of Elementary School Classrooms by 16S rRNA Gene and ITS Region Sequencing. *Indoor Air* **2021**, *31*, 1553–1562. <https://doi.org/10.1111/ina.12825>.
97. Park, J.-H.; Lemons, A.R.; Croston, T.L.; Roseman, J.; Green, B.J.; Cox-Ganser, J.M. More Diverse School Microbiota May Provide Better Protection against Respiratory Infections for School Staff. *Build. Environ.* **2025**, *271*, 112657. <https://doi.org/10.1016/j.buildenv.2025.112657>.

98. Fu, X.; Shama, A.; Norbäck, D.; Chen, Q.; Xia, Y.; Zhang, X.; Sun, Y. Exploring the Role of Indoor Microbiome and Environmental Characteristics in Rhinitis Symptoms among University Students. *Front. Microbiomes* **2024**, *3*, 1277177. <https://doi.org/10.3389/frmbi.2024.1277177>.
99. Dockx, Y.; Täubel, M.; Bijnens, E.M.; Witters, K.; Valkonen, M.; Jayaprakash, B.; Hogervorst, J.; Nawrot, T.S.; Casas, L. Indoor Green Can Modify the Indoor Dust Microbial Communities. *Indoor Air* **2022**, *32*, e13011. <https://doi.org/10.1111/ina.13011>.
100. Dockx, Y.; Täubel, M.; Bijnens, E.M.; Witters, K.; Valkonen, M.; Jayaprakash, B.; Hogervorst, J.; Nawrot, T.S.; Casas, L. Residential Green Space Can Shape the Indoor Microbial Environment. *Environ. Res.* **2021**, *201*, 111543. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111543>.
101. Soininen, L.; Roslund, M.I.; Nurminen, N.; Puhakka, R.; Laitinen, O.H.; Hyöty, H.; Sinkkonen, A.; Cerrone, D.; Grönroos, M.; Hui, N.; et al. Indoor Green Wall Affects Health-Associated Commensal Skin Microbiota and Enhances Immune Regulation: A Randomized Trial among Urban Office Workers. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 6518. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-10432-4>.
102. Danielski, I.; Svensson, Å.; Weimer, K.; Lorentzen, L.; Warne, M. Effects of Green Plants on the Indoor Environment and Well-being in Classrooms—A Case Study in a Swedish School. *Sustainability* **2022**, *14*, 3777. <https://doi.org/10.3390/su14073777>.
103. Daisey, J.M.; Angell, W.J.; Apte, M.G. Indoor Air Quality, Ventilation and Health Symptoms in Schools: An Analysis of Existing Information. *Indoor Air* **2003**, *13*, 53–64. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0668.2003.00153.x>.
104. Langiano, E.; Ferrara, M.; Falese, L.; Lanni, L.; Diotaiuti, P.; Di Libero, T.; De Vito, E. Assessment of Indoor Air Quality in School Facilities: An Educational Experience of Pathways for Transversal Skills and Orientation (PCTO). *Sustainability* **2024**, *16*, 6612. <https://doi.org/10.3390/su16156612>.

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.