



ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA



OPENDISTAL  
20 SETTEMBRE

# Effetti sul microbiota intestinale dell'esposizione di acque contaminate da microplastiche

**Lorenzo Nissen e Andrea Gianotti**

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-ambientali

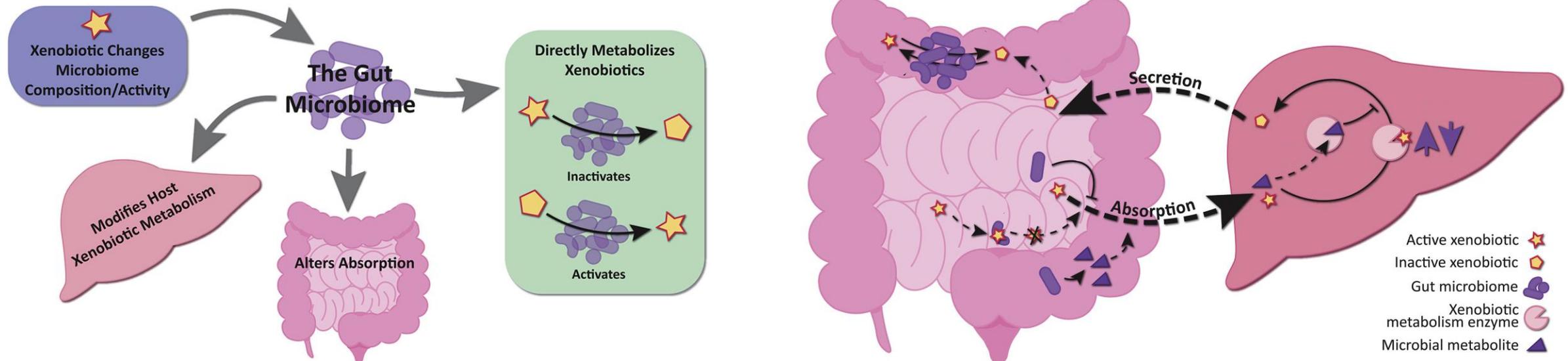
# XENOBIOTICI:

*Composti chimici che si trovano in un organismo, ma che non sono naturalmente prodotti o presenti in quell'organismo*

esempi: farmaci, additivi alimentari, inquinanti, tossine, **micro- e nanoplastiche**, pesticidi, POPs, PHAs, ecc.

Gli xenobiotici inoltre hanno un metabolismo comune nell'uomo

## METABOLISMO xenobiotici dell'asse INTESTINO-FEGATO

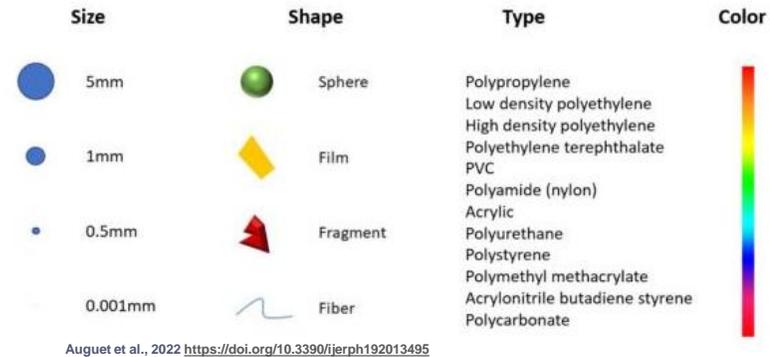
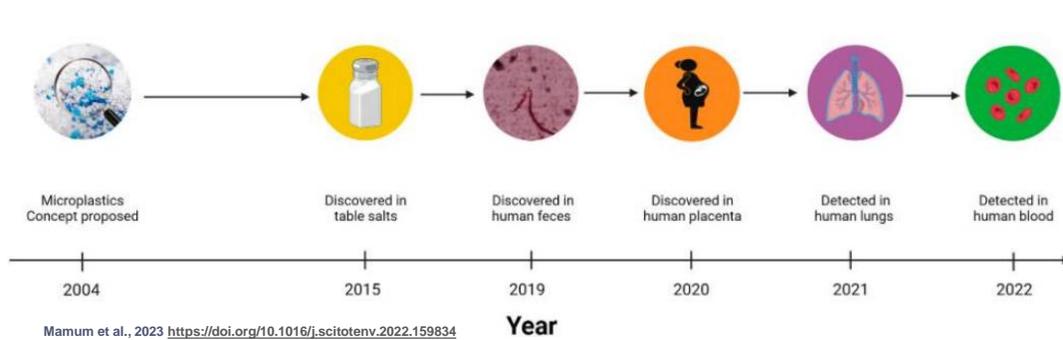


Collins and Patterson 2020

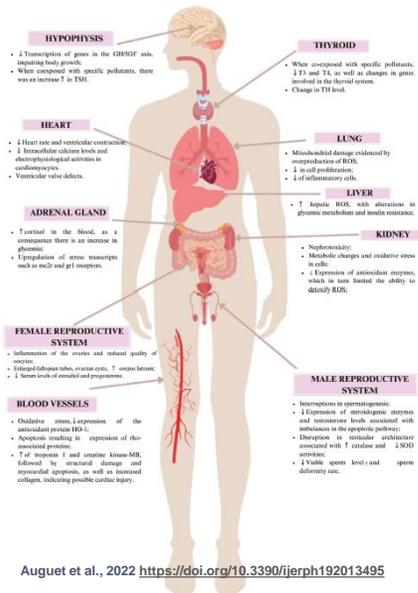
<https://doi.org/10.1016/j.apsb.2019.12.001>

# MICROPLASTICHE derivate dagli alimenti:

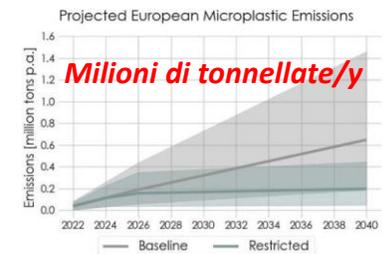
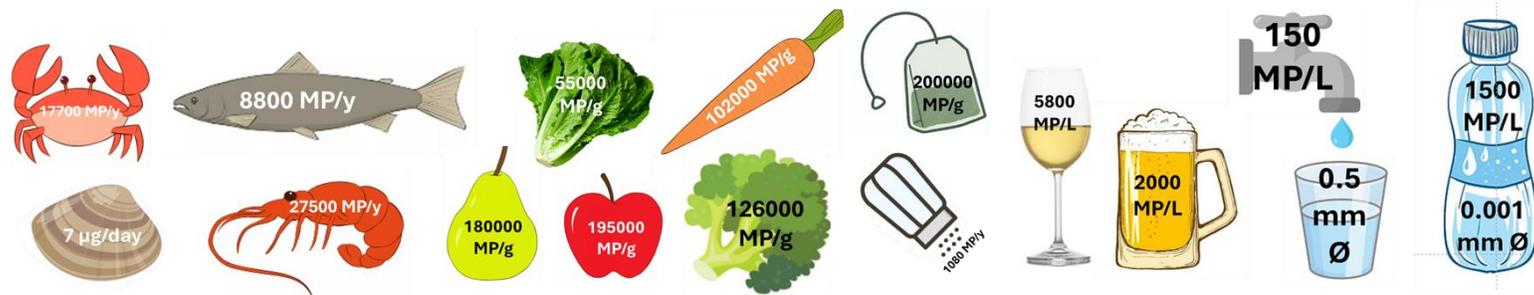
**Residui di plastiche reltive alla catena alimentare, dalla contaminazione dei suoli destinati all'agricoltura fino al packaging.**



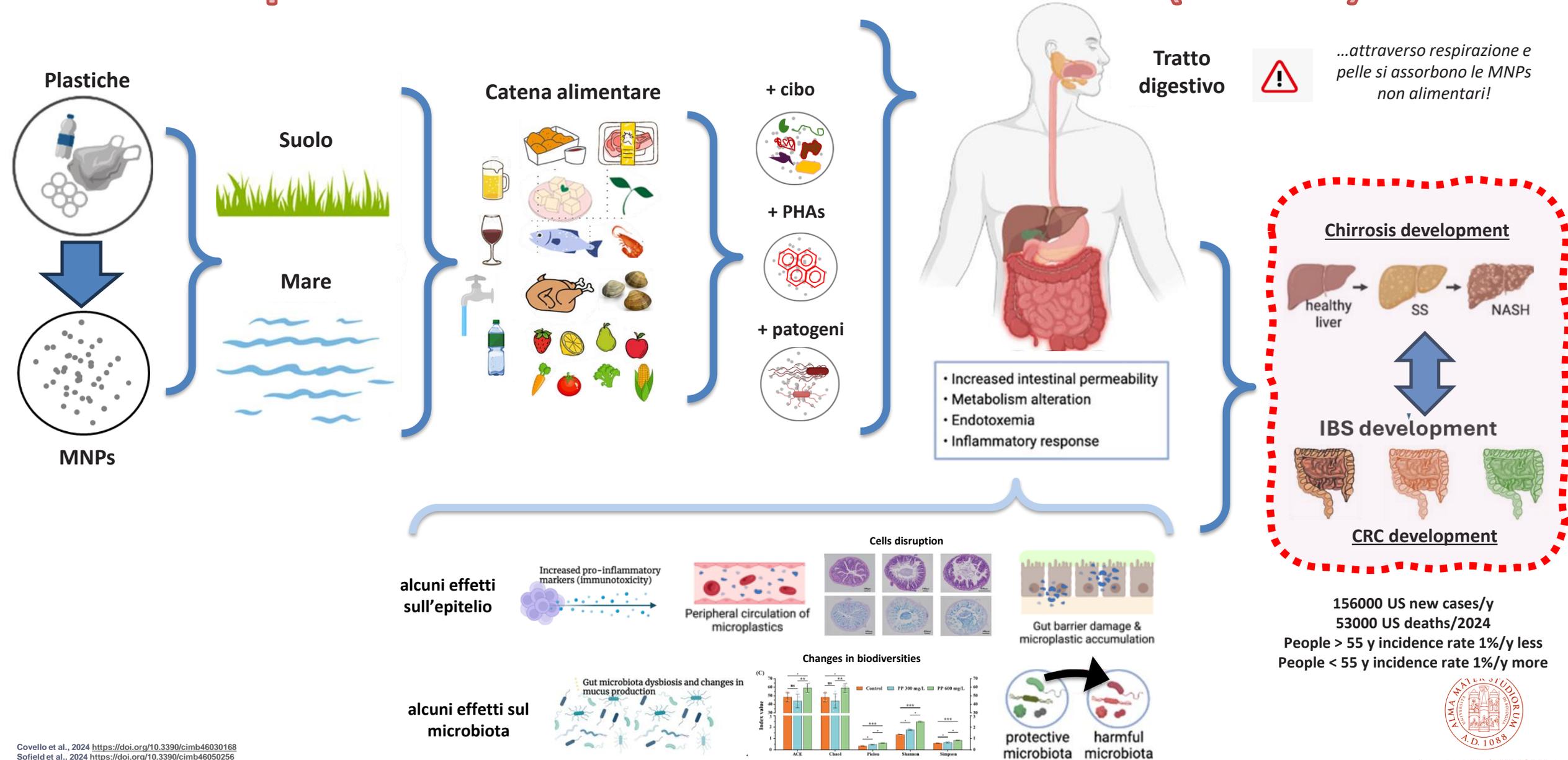
## tossicità multisito



**E' stato stimato che una persona ingerisce 53,864 particelle di microplastiche all'anno relative al consume di pesce, che equivalgono a 17 carte di credito. In media nel fegato umano si ritrovano fino a 6 tipi di MNPs differenti**



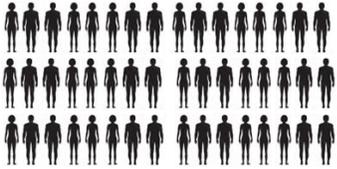
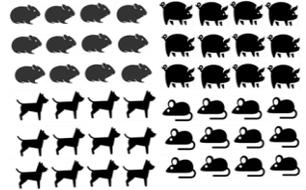
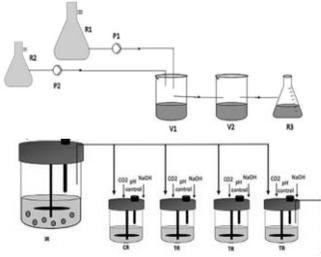
# Il percorso delle MICROPLASTICHE (MNPs)



Covello et al., 2024 <https://doi.org/10.3390/cimb46030168>  
 Sofield et al., 2024 <https://doi.org/10.3390/cimb46050256>  
 Milne et al., 2024 <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.123233>  
 Zhu et al., 2024 <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2024.120039>  
 Garrido-Gamarro and Costanzo, 2022. DOI 10.4060/cc2392en



# Come studiare il Risk Assessment verso il microbiota intestinale

<p>1)  <b>Trial clinici</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gold standard</li> <li>• Variabilità</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Costi elevati</li> <li>• Tempi lunghi</li> <li>• Volontari sani</li> </ul>
<p>2)  <b>Modelli animali</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Interazione ospite</li> <li>• Variabilità</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Etica</li> <li>• Fase crescita</li> <li>• Traslabilità</li> </ul>
<p>3)  <b>Modelli in vitro</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tempi brevi</li> <li>• Traslabilità</li> <li>• Pre-clinica</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• interazione ospite</li> <li>• Variabilità</li> <li>• Simulazione</li> </ul>



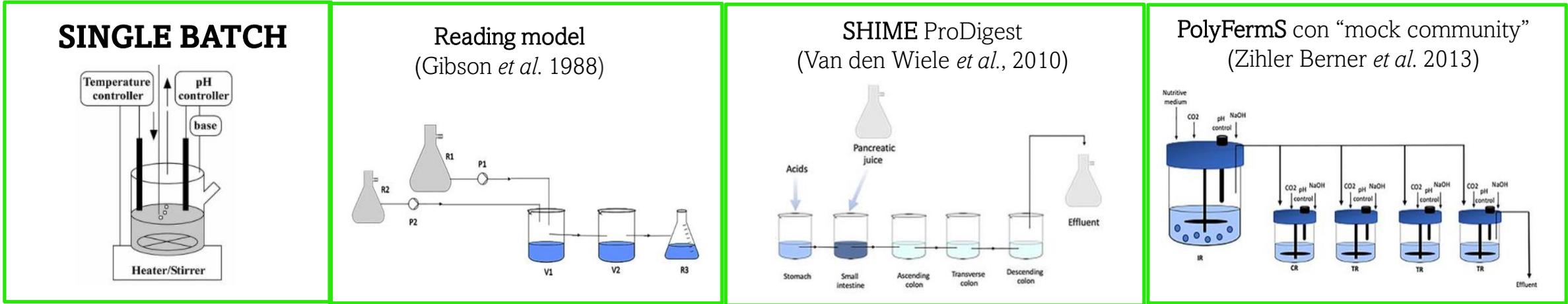
## The 3 R's of Animal Research

<p><b>Reduce</b></p>  <p>Reduce the number of animals used</p>	<p><b>Refine</b></p>  <p>Refine tests to cause animals less stress</p>	<p><b>Replace</b></p>  <p>Replace animal studies with other methods</p>
---	---	--



# Evoluzione dei modelli intestinali *in vitro*

*Differenti modelli per differenti applicazioni*



Standardizzazione/  
riproducibilità

somiglianza *in vivo*

complessità

«SHORT TERM» giorni

«LONG TERM» weeks



- **substrati**
- **dosi note**

- *Screening pre-clinico*
- *Nutrizione di precisione*
- *Nutrizione personalizzata*

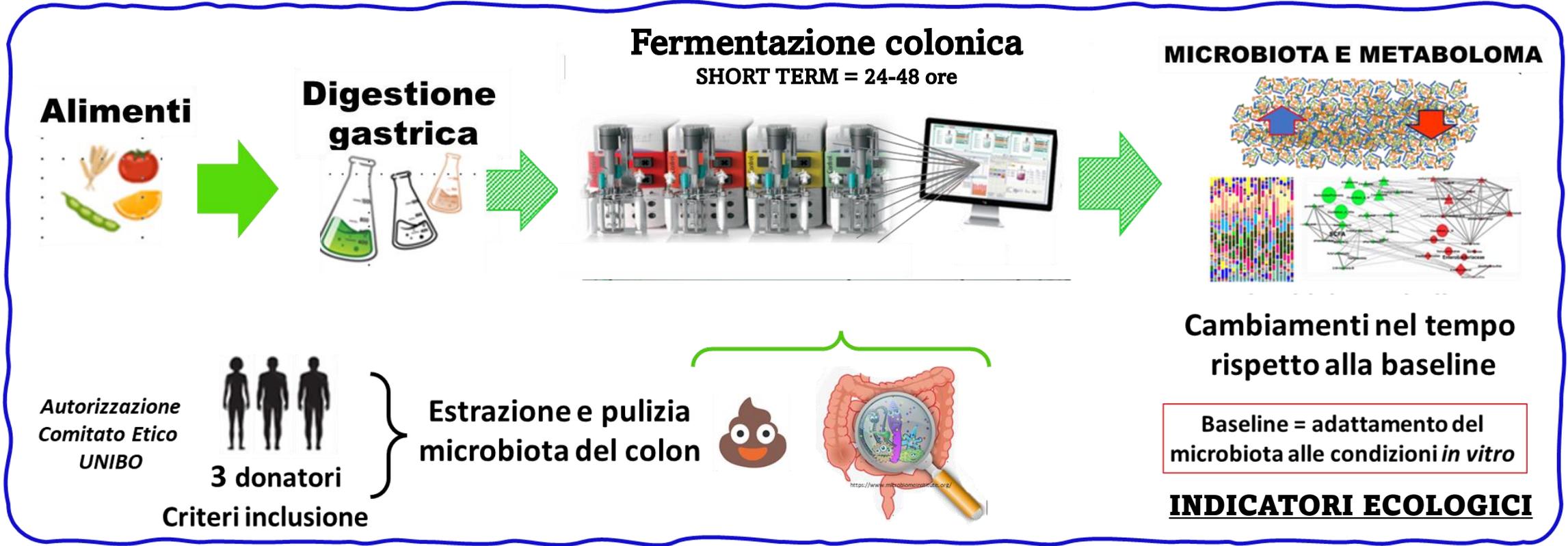


- **diete**
- **dosaggio**



# La piattaforma MICODE

## SIMULAZIONE *in vitro* della DIGESTIONE INTESTINALE

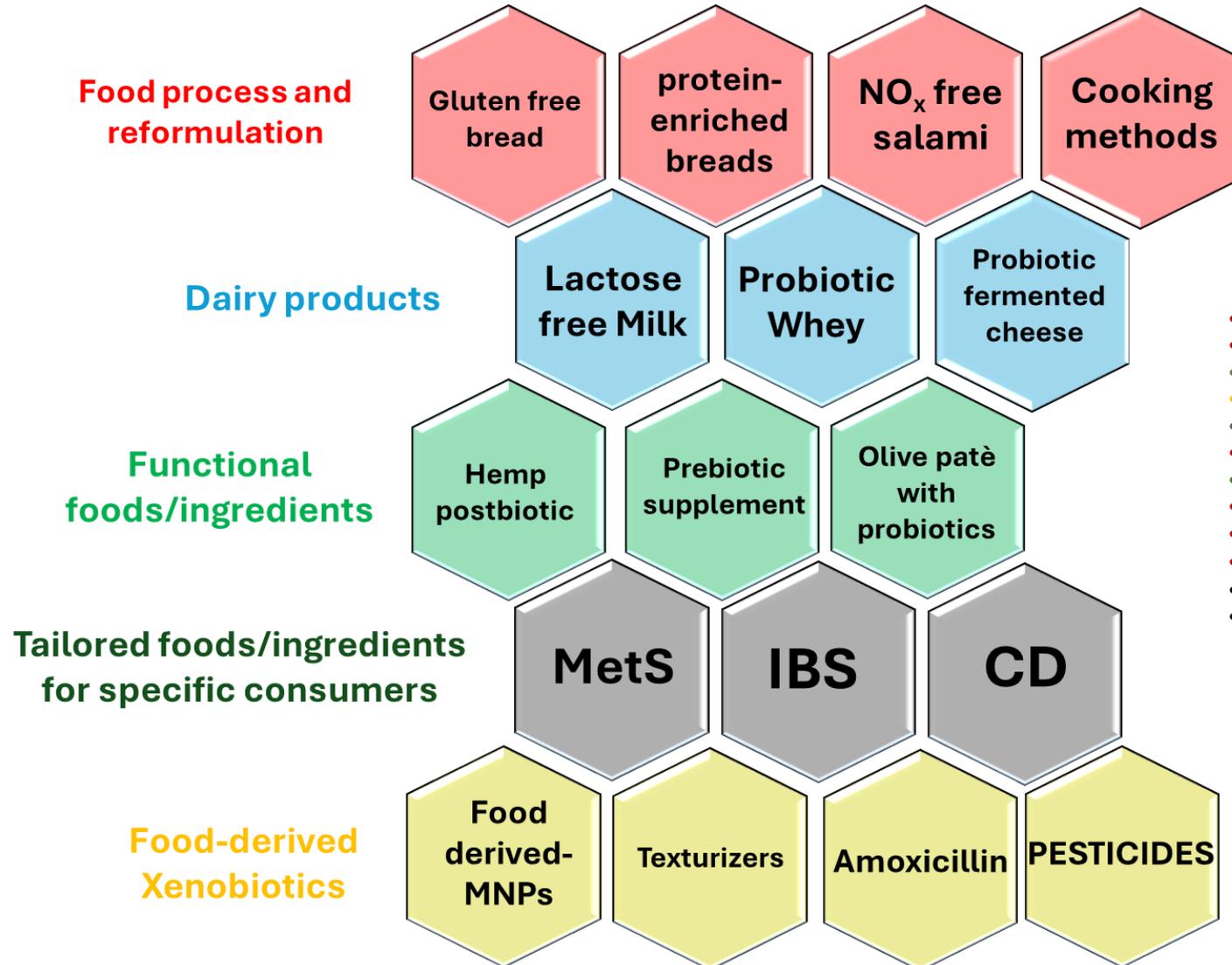
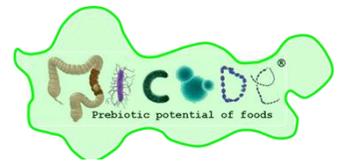


### INDICATORI ECOLOGICI

**Microbici:**  
Rapporto F/B; rapporto Clos IV/Clos I; Attività bifidogenica; Indice prebiotico; Biodiversità; etc...

**Metabolici:**  
Produzione SCFAs; Rapporto SCFAs; Produzione indolo/skatolo; Produzione fenolo/p-cresolo; Bioattivi; etc...

# Applicazioni di MICODE



- *Food Bioscience*, 53, 102568, ISSN 2212-4292 <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102568>.
- *Food & Function* (14), 3509-3525, <https://doi.org/10.1039/D3FO00085K>
- *Scientific Reports* 13, 1552. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-27726-w>.
- *Int. J. of Food Sc. and Tech.* 58(8) 4485-4494 <https://doi.org/10.1111/ijfs.16253>.
- *Appl. Microb. and Biotech.* 106, 7595-7614, <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12223-3>
- *Food Res. Int.*, 111702. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111702>
- *Foods* 10(10), 2371 <https://doi.org/10.3390/foods10102371>
- *Food & Function* 12, 10226 - 10238. DOI: [10.1039/D1FO01239H](https://doi.org/10.1039/D1FO01239H)
- *Nutrients*, 27;13(3):787. <https://doi.org/10.3390/foods10102371>
- *Food Chem.* 436, 137633 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137633>
- *Metabolites*, 12, 736. <https://doi.org/10.3390/metabo12080736>
- *FEMS Microbiology Letters*, 367(12), 1-10 fnaa097 <https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa097>



# Campioni, tempi e analisi

Full length article  
Single exposure of food-derived polyethylene and polystyrene microplastics profoundly affects gut microbiome in an *in vitro* colon model

Lorenzo Nissen <sup>a b d 1</sup>, Enzo Spisni <sup>c d 1</sup>, Renato Spigarelli <sup>c</sup>, Flavia Casciano <sup>a b d</sup>, Maria Chiara Valerii <sup>c</sup>, Elena Fabbri <sup>c</sup>, Daniele Fabbri <sup>c</sup>, Hira Zulfiqar <sup>c</sup>, Irene Coralli <sup>c</sup>, Andrea Gianotti <sup>a b d</sup>

Show more

+ Add to Mendeley Share Cite

<https://doi.org/10.1016/j.envint.2024.108884>

Get rights and content

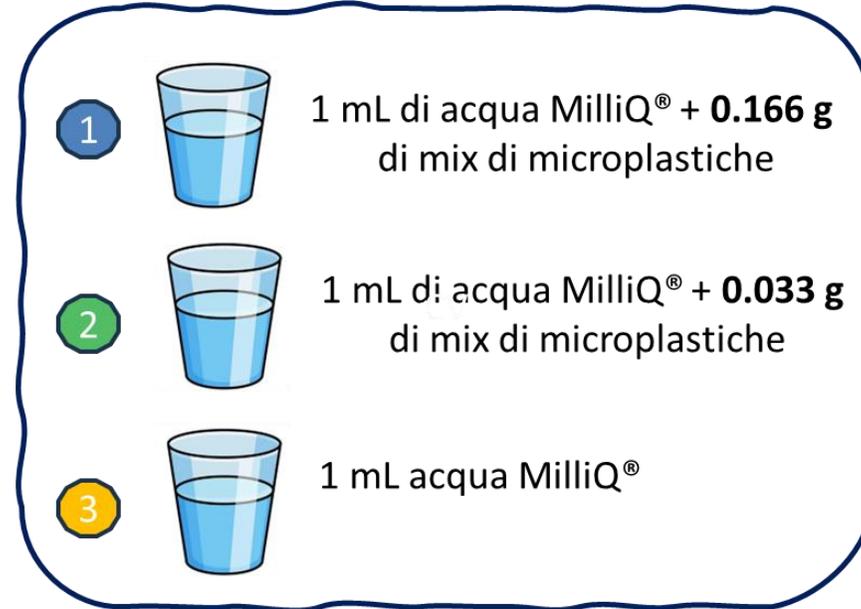
**Mix di microplastiche (1:1 w/w) =**  
microsfere polistirene (3 μm Ø)  
(Polysciences, USA) +  
microsfere polietilene (1–4 μm Ø)  
(Cospheric LLC, USA)



Q.tà max 5 g/week MP/persona.

**Q.tà max a pasto = di 0.166 g.**

Ampio intervallo di stima riportato  
in letteratura



**BL =**  
**adattamento**  
**del microbiota**  
***in vitro***

**T1 =**  
**24 ore di**  
**fermentazione**  
**colonica**

**EP =**  
**48 ore di**  
**fermentazione**  
**colonica**



Table 1. Concentration (mg/g dry weight) of PE and PS MPs in MICODE vessels (mean values±SD, averaged over the duration of the experiment).

Sample	PS	PE	PS+PE
mix 0.166	3.8±1.9	1.4±0.7	5.2
mix 0.033	0.7±0.5	0.5±0.1	1.2
water	< LOQ	< LOQ	<LOQ

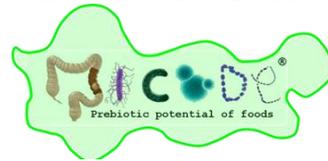
LOQ (Limit of Quantitation) was 0.5μg and 4.5μg for PS and PE, respectively.

# Protocollo generale del lavoro



## Digestione gastroduodenale Infogest®

## Fermentazione colonica



48 ore fermentazione  
3 tempi di prelievo  
2 repliche biologiche  
3 repliche tecniche  
pH 5.75  
DO<sub>2</sub> 0.0 – 0.1%

- [10.1039/D3FO00085K](https://doi.org/10.1039/D3FO00085K)
- [10.1111/ijfs.16518](https://doi.org/10.1111/ijfs.16518)
- [10.1111/ijfs.16253](https://doi.org/10.1111/ijfs.16253)
- [10.1016/j.fbio.2023.102568](https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102568)
- [10.1038/s41598-023-27726-w](https://doi.org/10.1038/s41598-023-27726-w)
- [10.1007/s00253-022-12223-3](https://doi.org/10.1007/s00253-022-12223-3)
- [10.1016/j.foodres.2022.111702](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111702)
- [10.3390/foods10102371](https://doi.org/10.3390/foods10102371)
- [10.3390/nu13030787](https://doi.org/10.3390/nu13030787)

## Cambiamenti rispetto alla baseline

## INDICATORI ECOLOGICI

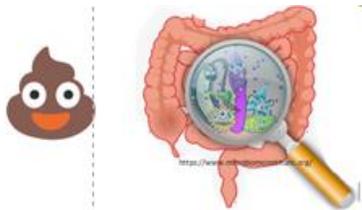
Microbiomica

Metabolomica

Interomica

+ QCs

Microbiota estratto e purificato da campioni fecali di **3 soggetti sani**



Comitato etico UNIBO

16S NGS



qPCR



SPME GC/MS



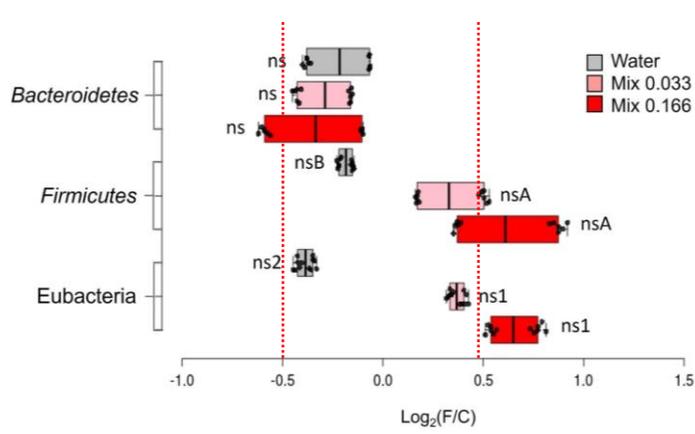
++ MODELLO STATISTICO ROBUSTO ++



# Alcuni RISULTATI su popolazioni microbiche selezionate

## core microbiota

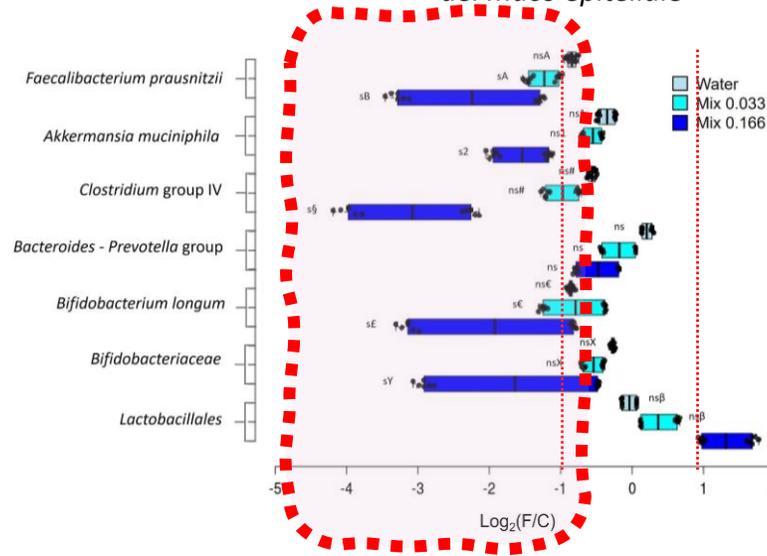
*Firmicutes* e *Bacteroidetes* sono i due phyla principali e costituiscono l'85% del microbiota totale. Il loro rapporto < 2 indica eubiosi intestinale e salute



- Simile carica dei batteri totali
- *Firmicutes* aumenta con mix 0.166
- *F/B* aumenta con mix 0.166

## μ benefici

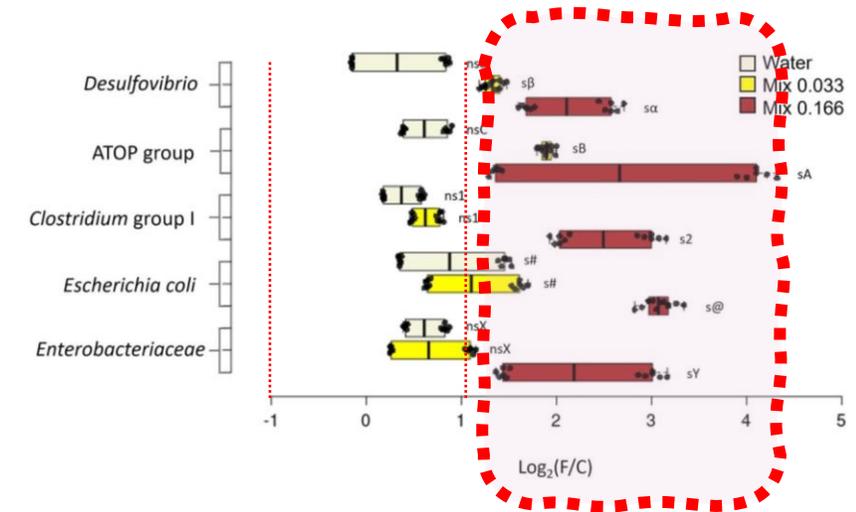
Gruppi «probiotici» di prima e seconda generazione, produttori di butirrato e regolatori del muco epiteliale



- Forte riduzione significativa
- Clos IV > F. prau > B. long > Bifidobact > A. muc
- Aumento significativo di *Lactobacillales*
- Nessun effetto su *Bacteroides*

## μ opportunisti

Gruppi opportunisti e patobionti, pro-infiammatori, marcatori di disbiosi, marcatori proteolitici e disruptori di membrana



- Forte aumento significativo
- ATOP > E. coli > Enterob > Clos I > Desulf
- Effetto ridotto con mix 0.033

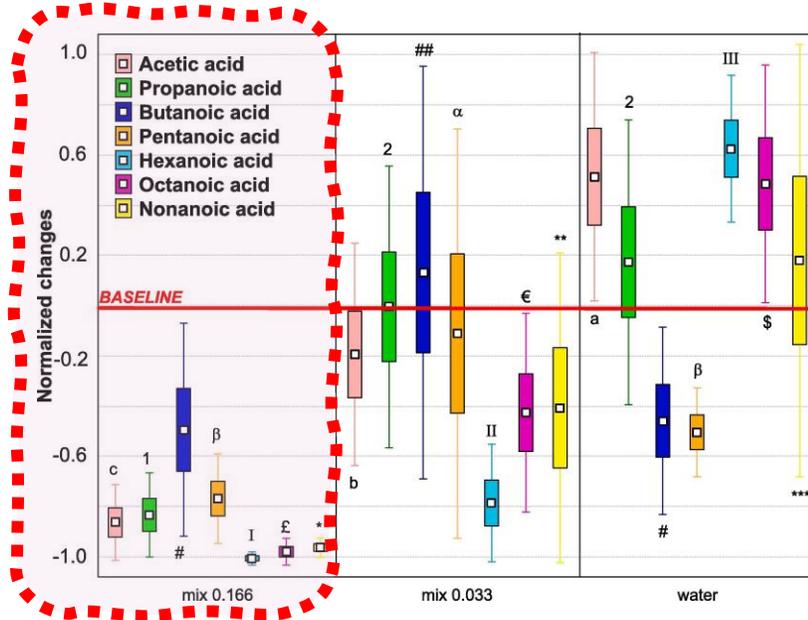




# Alcuni RISULTATI su composti microbici principali

## Composti benefici

Valori di baseline	
Composto	mg/kg ± SD
Acetic acid	1.544 ± 1.172
Propanoic acid	0.537 ± 0.387
Butanoic acid	0.346 ± 0.228
Pentanoic acid	0.237 ± 0.224
Hexanoic acid	0.153 ± 0.147
Octanoic acid	0.061 ± 0.070
Nonanoic acid	0.034 ± 0.037



- **Regolatori omeostatici**
- **Anti-infiammatori**
- **Immunostimolanti**
- **Metabolismo energetico**
- **Regolatori ormonali**
- **Funzionalità assi cervello e fegato**
- ...

Nogal et al., 2021  
Leblanc et al., 2017

Standard = 10000 ppm  
acetic:propanoic:butanoic  
(LOQ = 0.03 mg/kg and  
LOD = 0.01 mg/kg)

Di Cagno et al., 2017  
Bonfrate et al., 2020

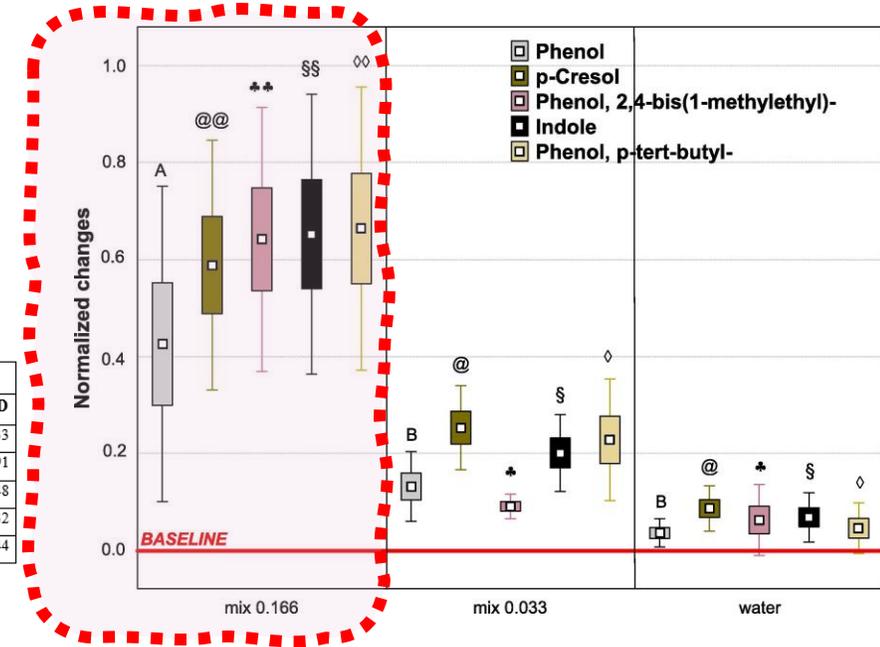


Acetic acid:  $p = 0.0033$   
Propanoic acid:  $p = 0.0014$   
Butanoic acid:  $p = 0.0030$   
Pentanoic acid:  $p = 0.0005$   
Hexanoic acid:  $p = 0.0066$   
Heptanoic acid:  $p = 0.0009$   
Octanoic acid:  $p = 0.0013$

ANOVA

## Composti negativi

Valori di baseline	
Composto	mg/kg ± SD
Phenol	0.150 ± 0.033
p-Cresol	1.159 ± 0.491
Phenol, 2,4-bis(1-methylethyl)-	0.582 ± 0.148
Indole	2.943 ± 0.832
Phenol, p-tert-butyl-	0.101 ± 0.044



- **Putrefazione proteica**
- **Cataboliti di TRP, TYR**
- **Pro-infiammatori**
- **Citotossici**
- **Epatotossici**
- **Genotossici**
- **Disruttori di membrana**
- ...

Wang et al., 2020  
Jennis et al., 2018

Standard = 10.000 ppm phenol  
(LOQ = 0.03 mg/kg and  
LOD = 0.01 mg/kg)

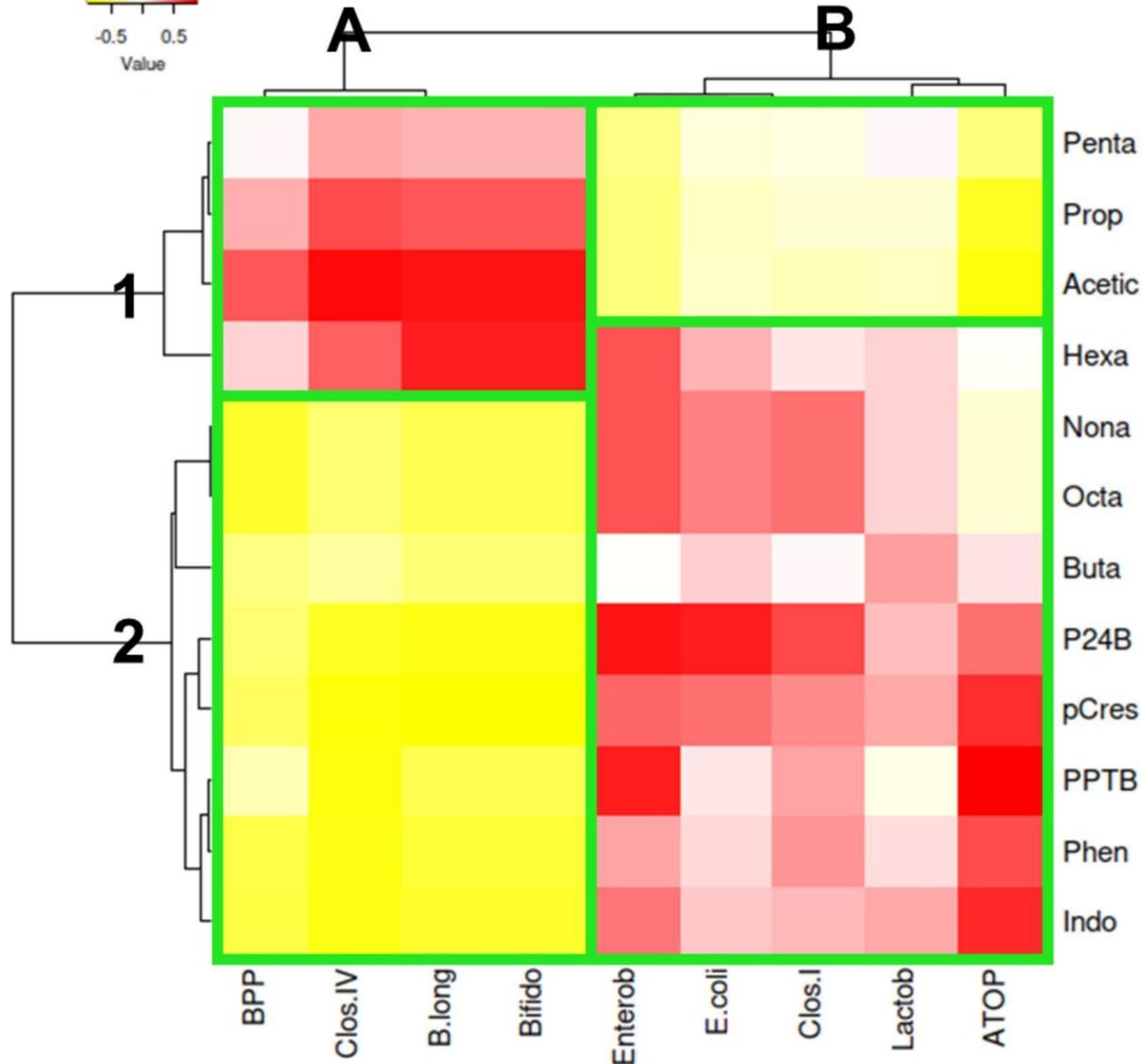
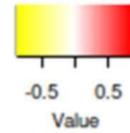
Di Cagno et al., 2017  
Bonfrate et al., 2020



Phenol:  $p = 0.0028$   
p-Cresol:  $p = 0.0063$   
Phenol, 2,4-bis-:  $p = 0.0013$   
Indole:  $p = 0.0016$   
Phenol, p-tert-butyl-:  $p = 0.0036$



# RESULTATI delle correlazioni



Il cluster B2 è quello che spiega meglio l'effetto negativo delle MP sul microbiota



In particolare, ci sono forti correlazioni positive significative fra p-cresolo, indolo e fenolo, p-tert-butile verso ATOP group ( $p = 0.72, 0.73, 0.89$ ), e fra P24B verso *Enterobacteriaceae* and *E. coli* ( $p = 0.80$  and  $0.77$ )

La scarsa produzione di SCFA e MCFA è correlata alla riduzione delle popolazioni benefiche che le producono



L'unica correlazione positiva significativa del butirrato è verso *Lactobacillales*, che aumenta la sua abbondanza in presenza di mix  $0.166$  ( $p = 0.82$ )



# TAKE HOME MESSAGES

***Il mix di MPs ha una risposta negativa sul microbiota in concentrazione dipendente***

**mix 0.166 < mix 0.033 < acqua**

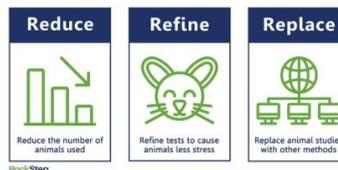
- 1) Disbiosi e riduzione muco
- 2) Aumento rapporto F/B
- 3) Effetto negativo Clostridi (aumento Clos I/Clos IV)
- 4) Aumento batteri proteolitici e pro- infiammatori (Enterob e ATOP)
- 5) Aumento distruttori di strato mucoso (Desulfovibrio)
- 6) Riduzione probiotici 2<sup>nd</sup> gen. (*Faecalibacterium e Akkermansia*)
- 7) Riduzione probiotici (*Bifidobacterium*)
- 8) Riduzione metabolite benefici (SCFAs e MCFAs)
- 9) Aumento metaboliti negativi (p-Cresolo e indolo)

**Analisi metagenomiche e modello con interazione cellulare**

*This study serves as a pre-clinical basis and can be validated by in vivo trials*

**(EU 2010/63)**

## The 3 R's of Animal Research



*This study save the life of at least 30 mice!*



# CREDITI

cost  
EUROPEAN COOPERATION  
IN SCIENCE & TECHNOLOGY

COST Actions Funding COST Academy About

Open call  
Fund your network

SEARCH e-COST MENU

CA23110 - International networking on in vitro colon models simulating gut microbiota mediated interactions (INFOGUT)

ARTICLE AWARDS  
FEMS Microbiology Letters 2020  
FEMS JOURNALS  
investing in science

FOODOMICS 2020  
10th International Conference on Foodomics

Themed collection  
Food & Function HOT Articles 2023  
Impact of cooking methods of red-skinned onion on metabolic transformation of phenolic compounds and gut microbiota changes

BÉNÉFIQ2023  
International Rendezvous on Health Food and Ingredients  
OCTOBER 2023, 4-5  
Quebec City Convention Centre, Canada

The 5th International European Conference on Food, The Future of Technology, Sustainability, and Nutrition in the Food Domain  
28-30 October 2024 | Online

ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA  
A.D. 1088

MICODE  
Prebiotic potential of foods

CENTRO INTERDIPARTIMENTALE  
DI RICERCA INDUSTRIALE  
AGROALIMENTARE (CIRIAGRO)  
andrea.gianotti@unibo.it  
lorenzo.nissen@unibo.it  
[https://twitter.com/micode\\_lab](https://twitter.com/micode_lab)

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TERAMO

SAPIENZA  
UNIVERSITÀ DI ROMA

UNIMORE  
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MODENA E REGGIO EMILIA

Bambino Gesù  
OSPEDALE PEDIATRICO

CRBa

STEROGLASS®

DrSchär

TOD  
GUT

## The Food Microbiology group at University of Bologna





ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

**Credits:**

**Lorenzo Nissen e Andrea Gianotti**

[lorenzo.nissen@unibo.it](mailto:lorenzo.nissen@unibo.it)

[andrea.gianotti@unibo.it](mailto:andrea.gianotti@unibo.it)



[www.unibo.it](http://www.unibo.it)