



*Evidencia de la actividad antifúngica y antimicrobiana de bacterias ácido lácticas en diversos sustratos fermentados para uso alimenticio*

*Evidence of the antifungal and antimicrobial activity of lactic acid bacteria in various fermented substrates for food use*

*Evidência da atividade antifúngica e antimicrobiana de bactérias lácticas em vários sustratos fermentados para uso alimentar*

Galo Insuasti C<sup>I</sup>

[insuastig@yahoo.es](mailto:insuastig@yahoo.es)

<https://orcid.org/0000-0002-6783-0485>

Carlos Pilamunga C<sup>II</sup>

[carlos.pilamunga@esPOCH.edu.ec](mailto:carlos.pilamunga@esPOCH.edu.ec)

<https://orcid.org/0000-0003-1262-864X>

Janneth María Gallegos Núñez<sup>III</sup>

[jgallegos@esPOCH.edu.ec](mailto:jgallegos@esPOCH.edu.ec)

<https://orcid.org/0000-0002-1550-8494>

Ana Rafaela Pacurucu Reyes<sup>IV</sup>

[apacurucu@esPOCH.edu.ec](mailto:apacurucu@esPOCH.edu.ec)

<https://orcid.org/0000-0003-3539-9632>

**Correspondencia:** [insuastig@yahoo.es](mailto:insuastig@yahoo.es)

Ciencias Técnicas y Aplicadas

Artículo de Investigación

\* **Recibido:** 23 de diciembre de 2022 \* **Aceptado:** 12 de enero de 2023 \* **Publicado:** 22 de febrero de 2023

- I. Seguridad Alimentaria Grupo de Investigación y Desarrollo SAGID, Facultad de Ciencias, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.
- II. Seguridad Alimentaria Grupo de Investigación y Desarrollo SAGID, Facultad de Ciencias, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.
- III. Seguridad Alimentaria Grupo de Investigación y Desarrollo SAGID, Facultad de Ciencias, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.
- IV. Seguridad Alimentaria Grupo de Investigación y Desarrollo SAGID, Facultad de Ciencias, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.



## Resumen

Existen estudios que demuestran el potencial antimicrobiano y antifúngico de las bacterias ácido lácticas, en este contexto se puede considerar que estas bacterias manifiestan explícitamente los dos tipos de actividad en cualquier momento o circunstancia, particularidad que puede considerarse importante cuando se trata de ejecutar aplicaciones de las bacterias ácido lácticas en el campo de los alimentos que son susceptibles a contaminación por bacterias y hongos. Se realizó una revisión narrativa mediante búsquedas en las bases de datos Science Direct, Taylor and Francis Online, e-Libro, Scielo, PubMed y Redalyc, sin restricciones de fechas ni de tipos de estudio, en idiomas español e inglés, considerando tanto artículos completos como resúmenes. De acuerdo con la evidencia existente, una explicación para este comportamiento es la diversidad de metabolitos secundarios que simultáneamente podrían tener efectos antimicrobianos y antifúngicos, además, a nivel estructural el efecto antagónico sobre hongos y bacterias básicamente se atribuye a su acción química sobre la composición de la membrana celular. Las bacterias ácido lácticas tienen una elevada importancia aplicativa que debería ser considerada en la fermentación de alimentos para alcanzar una conservación óptima. Las investigaciones específicas de distintos metabolitos generados de forma aislada o en grupo podrían permitir la identificación de posibles acciones sinérgicas.

**Palabras Clave:** bacterias ácido lácticas; antagonismo; antifúngico; antimicrobiano; alimentos fermentados.

## Abstract

There are studies that demonstrate the antimicrobial and antifungal potential of lactic acid bacteria, in this context it can be considered that these bacteria explicitly manifest both types of activity at any time or under any circumstances, a particularity that can be considered important when it comes to executing applications of the lactic acid bacteria in the food field that are susceptible to contamination by bacteria and fungi. A narrative review was carried out through searches in the Science Direct, Taylor and Francis Online, e-Libro, Scielo, PubMed and Redalyc databases, without restrictions on dates or types of study, in Spanish and English, considering both complete articles as summaries. According to the existing evidence, one explanation for this behavior is the diversity of secondary metabolites that could simultaneously have antimicrobial and antifungal

effects; moreover, at a structural level, the antagonistic effect on fungi and bacteria is basically attributed to their chemical action on the composition of the cell membrane. Lactic acid bacteria have a high application importance that should be considered in food fermentation to achieve optimum conservation. Specific investigations of different metabolites generated in isolation or in groups could allow the identification of possible synergistic actions.

**Keywords:** lactic acid bacteria; antagonism; antifungal; antimicrobial; fermented foods.

## Resumo

Existem estudos que demonstram o potencial antimicrobiano e antifúngico das bactérias lácticas, neste contexto pode-se considerar que estas bactérias manifestam explicitamente ambos os tipos de atividade a qualquer momento ou em qualquer circunstância, uma particularidade que pode ser considerada importante quando se trata de realizando aplicações de bactérias lácticas na área alimentícia que são susceptíveis à contaminação por bactérias e fungos. Foi realizada uma revisão narrativa por meio de buscas nas bases de dados Science Direct, Taylor and Francis Online, e-Libro, Scielo, PubMed e Redalyc, sem restrições de datas ou tipos de estudo, em espanhol e inglês, considerando tanto os artigos completos quanto os resumos. De acordo com as evidências existentes, uma explicação para esse comportamento é a diversidade de metabólitos secundários que poderiam ter simultaneamente efeitos antimicrobianos e antifúngicos; além disso, em nível estrutural, o efeito antagônico sobre fungos e bactérias é atribuído basicamente à sua ação química na composição da membrana celular. As bactérias do ácido láctico têm uma alta importância de aplicação que deve ser considerada na fermentação de alimentos para alcançar a conservação ideal. Investigações específicas de diferentes metabólitos gerados isoladamente ou em grupos podem permitir a identificação de possíveis ações sinérgicas.

**Palavras-chave:** bactérias do ácido láctico; antagonismo; antifúngico; antimicrobiano; alimentos fermentados.

## Introducción

Las BAL (bacterias ácido lácticas) actualmente son muy conocidas por su diversidad en relación a bondades sobre la salud, su efecto probiótico en los alimentos fermentados. Su utilidad es muy variada, existiendo un gran número de fundamentos que justifican sus aplicaciones y en el presente caso se busca revisar el efecto antifúngico que pueda ser aplicado sobre los cereales y sus derivados.

La presencia de las BAL en los alimentos se considera seguro para el ser humano al tener comportamientos probióticos principalmente formadores de ácido láctico y otros metabolitos que generan un ambiente inadecuado para el desarrollo de microorganismos patógenos en los alimentos fermentados.

La función probiótica de las de bacterias lácticas está respaldado por amplios reportes científicos que afirman este beneficio. (Ramírez et al., 2011).

La función de géneros de bacterias lácticas y otros microorganismos como probióticos ha despertado el interés de muchos investigadores, existiendo una gran cantidad de reportes científicos que afirman los beneficios de los probióticos en la salud. (Ramírez et al., 2011).

Cada género y especie se describe utilizando un formato estandarizado, y se evalúa la importancia relativa de cada especie en aplicaciones alimentarias, agrícolas y médicas. Además, se brinda una cobertura detallada de ciertos grupos bacterianos (como *Bifidobacterium*) a menudo asociados con las BAL. (Holzapfel & Wood, 2014). En relación a una aplicación agrícola, (Drouin et al., 2022) refiere un estudio sobre ensilado de alfalfa inoculado con bacterias lácticas durante y después del ensilaje, en el cual concluye una mejora en la producción de compuestos antifúngicos y reducción del número de levaduras cultivables. Una evidencia adicional de las BAL con su efecto antifúngico se observa en el estudio realizado por (Petkova et al., 2022), en el mismo que se menciona como potenciales responsables del efecto antifúngico, a los metabolitos como el ácido láctico, ácido acético, etanol, dióxido de carbono y bacteriocinas, en la bioconservación de uvas de mesa premeditadamente contaminadas con *Botrytis cinérea*, al ser tratadas con cultivo de BAL del género *Lactiplantibacillus*, esta bacteria a más de su efecto antifúngico, muestra una actividad antimicrobiana como también lo menciona (Sun et al., 2022) en su estudio del rol de este microorganismo durante el almacenamiento anaerobio del maíz extraído para la producción de biogás.

Algunos grupos de géneros mencionados son: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*, como productores de metabolitos que pueden ser: ácidos orgánicos, sustancias preservantes, polisacáridos, vitaminas, endulzantes, aromatizantes y saborizantes entre otros. (Parra Huertas, 2010). El autor (Liang et al., 2022) menciona como metabolitos antifúngicos a los ácidos grasos 10-OH 18: 1 y el acetato. También se han caracterizado algunos dipéptidos cíclicos con efecto antifúngico de *Lactocaseibacillus paracasei* ZX1231 para la elaboración de películas en la conservación de alimentos, según Zheng “cuatro dipéptidos cíclicos

(CDP) fueron descubiertos del SFC (sobrenadante libre de células) elaborado, se encontraron ciclo (Phe-Leu) y ciclo(Antranilia-Pro) en la familia Lactobacillaceae por primera vez, que inhibieron la filamentación de *C. albicans* al dirigirse a la vía RAS1-cAMP-PKA. Las actividades antifúngicas del SFC se combinaron de manera óptima con una matriz de nanocelulosa bacteriana (BNC) para preparar las películas” (Zheng et al., 2022).

El deterioro por hongos es una de las principales causas de importante pérdida económica en la industria de la panificación y en general en almacenamiento de cereales, particularmente se menciona como un factor influyente en esta industria. Las esporas de los hongos que están en la materia prima son el resultado de la contaminación de los mohos transportados a través del aire del ambiente, situación que se convierte en un problema en cualquier fase del procesamiento de cereales. El calor aplicado durante un horneado se menciona que puede eliminar a los hongos, investigativamente el efecto del calor ha sido estudiada con la influencia de un extracto de bacterias lácticas con actividad antifúngica (*Lactobacillus plantarum* CRL 778) a diferentes tiempos de tratamiento con el objetivo de eliminar la presencia de hongos y sus esporas. (Gerez et al., 2015).

El efecto del calor si bien es cierto es un factor que va a eliminar hongos o esporas en los cereales procesados, éstos en su estado más natural son proclives a la presencia de estos microorganismos, en su estado natural se sugiere buscar alternativas para su eliminación, por ejemplo, la utilización de bacterias del género *Bacillus* en el control biológico de los hongos fitopatógenos de enfermedades fúngicas, el control se lo atribuye a metabolitos con actividad antifúngica. Se han utilizado aislados del género *Bacillus* con efecto antagónico sobre hongos fitopatógenos en cultivos de arroz. (Tejera et al., 2012).

Cepas de *Bacillus* muestran un efecto antagónico sobre *Fusarium* fitopatógeno en cultivos hortícolas. Un ensayo sobre antagonismo en un periodo de siete días menciona inhibición por parte de *Bacillus* sobre *Foxisporum*, este hongo es inhibido por encima del 80 % y frente a *F. moniliforme* supera la inhibición de crecimiento sobre el 50 %. (Badía et al., 2017).

También se reporta el antagonismo (es la inhibición, deterioro o muerte de un microorganismo por acción de otro, (Pérez-y-Terrón et al., s. f.)) de *Bacillus spp* sobre hongos fitopatógenos en cultivos de arroz, estudio de mucha importancia al considerarse que el arroz es un alimento de elevada demanda en el mercado, en un trabajo se utilizó siete aislados del género *Bacillus* para observar el efecto antagónico sobre los hongos fitopatógenos en el cultivo de arroz. Se obtuvieron altos porcentajes de inhibición del crecimiento de los hongos con todos los aislados de *Bacillus*



estudiados y se determinó que a los siete días se observan los mayores porcentajes de inhibición del crecimiento para los hongos empleados bajo las condiciones de laboratorio utilizadas. (Tejera et al., 2012).

Los aislados de BAL muestran actividad toxigénica inhibitoria contra el *A. flavus* toxigénico. El ensayo in vitro reveló una disminución notable en la cantidad de aflatoxina B1 (AFB1) y B2 (AFB2)- micotoxinas (sustancias químicas producidas por cepas toxigénicas de hongos: *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* (Bogantes- Ledezma et al., 2004)), en mijo y sorgo contaminados tratados con monocultivo y cocultivo BAL, respectivamente. (Ibitoye et al., 2021).

El reino fungi se caracteriza por contaminar productos alimenticios, creando la necesidad de utilizar aditivos sintéticos que son de suma preocupación para los consumidores en relación a su seguridad, en este contexto ha surgido la iniciativa de utilizar agentes naturales provenientes de microorganismos (BAL) y otros que están dirigidos a proteger o conservar los alimentos. Esta utilidad de sustancias naturales es considerada como un biocontrol en la proliferación de hongos y de ese modo se consigue evitar la descomposición de los alimento por el reino fungi. (Ribes et al., 2018).

Sobre el efecto antimicrobiano y antifúngico o antagonismo de las BAL se dan varias explicaciones desde el punto de vista mecanístico que permiten entender el efecto considerado como biocontrol por parte de los diversos metabolitos producidos por las BAL. Algunos de los efectos que se mencionan son: disrupción del metabolismo celular (ácido láctico), inactivación de biomoléculas por reacción en cadena de aniones superóxido y activación del sistema lactoperoxidasa (peróxido de hidrógeno), inhibición de decarboxilación enzimática (dióxido de carbono), interferencia de utilización de arginina (diacetilo), disrupción de la membrana citoplasmática (bacteriocinas-péptidos sintetizados por algunas bacterias ácido lácticas.(Preciado et al., 2013), (Beristain-Bauza, 2012)). Los géneros de BAL más estudiadas en relación a su actividad antifúngica se menciona a *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc*. (Olivares Tenorio & Klotz Ceberio, 2020).

El mecanismo antagónico observado de las BAL sobre los hongos se centran en aspectos mencionados como: la capacidad para dañar biomembranas por interferencias sobre la ósmosis de la interacción de la características lipofílicas de las biomembranas con las enzimas presentes en las mismas. Con relación al efecto antimicótico se menciona que ciertas proteínas y polipéptidos actúan degradando polímeros de la membrana celular, alterando los ribosomas e inhibiendo la síntesis de ADN. (Montes-Belmont, 2009).

Los cereales y pseudocereales son adecuados para fermentaciones microbianas debido a su contenido en polisacáridos que sirven como fuente de carbono y energía para microorganismos durante la fermentación. También son ricos en minerales, vitaminas y otros factores de crecimiento. Se ha observado que los cereales se relacionan aplicativamente con las BAL, algunas de las cuales procedemos a mencionar: bebidas a base de cereales que pueden ser mejoradas en su calidad, generación de nutrientes funcionales e ingredientes alimentarios a partir de las BAL. El proceso fermentativo es catalogado como seguro, económico, adecuado como conservante natural y generador de características como textura, sabor, aroma y ayuda en los procesos de nutrición. Según lo expresado anteriormente un cultivo iniciador de BAL con cereales es necesario optimizarlo para conseguir cepas con características bioconservantes desde elaborados alimenticios de cereales, adicionalmente se sumaría otras características como antifúngicas, antimicrotóxicas, que permitirán neutralizar péptidos tóxicos y generar aminoácidos, oligosacáridos que permitirían formar alimentos funcionales prebióticos que podrían competir con productos lácteos existentes. (Waters et al., 2015).

Existe el interés de identificar y aislar cepas de BAL desde cereales y otras partes de vegetales para aprovecharlos tecnológicamente de distintas formas, tal es así que fermentos de yuca y granos de maíz han sido estudiados encontrándose cepas de algunas bacterias que han manifestado mejor y rápida producción de ácido (*Lactobacillus plantarum*), producción lenta de ácido (*L. fermentum*), producción de peróxido de hidrógeno, actividad amilácea (*L. pentosus*), actividad  $\beta$ -glucosidasa (*Lactobacillus plantarum* y *L. fermentum*). (Sanni et al., 2013).

Se ha estudiado una mezcla de harina de cebada fermentada con residuos de merluza (*Merluccius hubbs*), se utilizó ácido láctico como una muestra comparativa, y en las muestras biológicas se observó disminución de pH manteniéndose la fermentación estable hasta el final. En el experimento se observó otros aspectos en esta mezcla, como: el aumento de la concentración de péptidos y la concentración de fósforo aumentaron en los biosilos, mientras que en el control los valores se mantienen casi estables. Con relación a la tripsina la actividad inhibitoria se suprimió en ambos biosilos, mientras que en el control los factores anti nutricionales siguen siendo activos de ahí que se puede observar la posibilidad de una eficacia como inoculante sobre silos. (Marguet et al., 2017). Una aplicación organoléptica relacionada con las BAL se describe en su influencia sobre la textura y el sabor de los fideos de arroz de un alimento tradicional chino fundamentado en la actividad fermentativa no controlada de las bacterias ácido lácticas, se identificaron siete especies de



*Lactobacillus*: *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus salivario*, *Lactobacillus helvético*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus fermento*, *Lactobacillus amylovorus* y *Lactobacillus Oris*. (Li et al., 2015).

Otra aplicación de las BAL es en la elaboración de múltiples bebidas, particularmente se menciona una bebida elaborada a partir de harina de arroz y una oleaginosa como el ajonjolí con cultivos probióticos, con la finalidad de conseguir buena aceptabilidad organoléptica y características nutricionales. Para realizar combinaciones entre cereales y oleaginosas u otros se utiliza el software Desing Expert 6.01 que procesa variables como harina de arroz, ajonjolí tostado, agua, azúcar como edulcorante, carboximetilcelulosa como estabilizante. Al final de la elaboración de la bebida se valora aspectos de estabilidad, aceptabilidad, composición nutricional y calidad microbiológica. Se ha usado glucosa como sustrato fermentable de microorganismos como *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei*. (Hernández-Monzón et al., s. f.).

### Aplicaciones

La aplicación más común de las BAL es la fermentación con la finalidad de elaborar bebidas alimenticias o elaborados sólidos con cereales u otros grupos de alimentos manifestando actividad conservante en las distintas presentaciones alimenticias, actividad fundamentada en su efecto antagónico para con los hongos que frecuentan a las materias primas. A continuación, se muestra algunas aplicaciones de las bacterias ácido lácticas.

**Tabla 1:** Algunas aplicaciones de BAL en alimentos relacionados con cereales.

BACTERIA LÁCTICA	FUENTE DE BACTERIAS	APLICACIÓN	REFERENCIA	FUENTE CONSULTADA
<i>Bifidobacterium</i>		Generación de características organolépticas. Aplicación como prebiótico.	(Holzapfel & Woo D, 2014)	Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy

<i>Lactococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Pedococcus</i> , <i>Vagococcus</i> y algunos lactobacilos	Alimentos fermentados.	Probiótico. Fermentación láctica. Generación de características organolépticas. Medio de crecimiento.	(Ramírez et al., 2011)	Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud
<i>Lactococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> y <i>Pediococcus</i>	Alimentos fermentados	Preservantes. Mejoradores de características organolépticas.	(Parra Huertas, 2010)	Review. bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos
<i>Lactobacillus</i> <i>plantarum</i>	Productos de panificación Almacenamiento de cereales	Antifúngico	(Gerez et al., 2015)	1. Cultivo iniciador antifúngico para pan envasado: influencia de dos condiciones de almacenamiento
Género <i>Bacillus</i>	Cultivos de arroz	Antifúngico	(Tejera et al., 2012)	Antagonismo de <i>Bacillus spp.</i> frente a hongos fitopatógenos del cultivo del arroz ( <i>Oryza sativa L.</i> )

Géneros de <i>Bacillus</i> .	Cultivos hortícolas	Antifúngico	(Badía et al., 2017)	Antagonismo de <i>Bacillus</i> frente a hongos fitopatógenos de cultivos hortícolas
Aislados de bacterias ácido lácticas.	Cereales contaminados artificialmente	Inhibición de <i>A. flavus</i> toxigénico	(Ibitoye et al., 2021)	Bacterias del ácido láctico biodesintoxicando aflatoxinas con cereales contaminados, mejoran los efectos toxicológicos y mejoran los parámetros hematohistológicos en ratas albinas
BALs y sus metabolitos asociados a partes vegetales.	Varias fuentes (Revisión)	Incorporación de BAL en emulsiones y nanoemulsiones de aceite en agua, películas comestibles y envases activos combinados con conservantes naturales para mejorar su eficacia antifúngica.	(Ribes et al., 2018)	Prevención del deterioro fúngico en productos alimenticios que utilizan compuestos naturales: una revisión

Cepas de <i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>Propionibacterium freudenreichii</i>	Bacterias lácticas del listado europeo de seguridad QPS	Evaluación antifúngica.	(Olivares Tenorio & Klotz Ceberio, 2020)	Evaluación del efecto antifúngico de metabolitos de cultivos bioprotectores: aplicación en derivados lácteos
Cultivos iniciadores de BALs	Diversas fuentes (Revisión)	Asociación de BAL, para la biopreservación antifúngica, antimicotoxinas en bebidas de cereales.	(Waters et al., 2015)	Bacterias del ácido láctico como una fábrica celular para la entrega de biomoléculas e ingredientes funcionales en bebidas a base de cereales: una revisión
Cepas de <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>L. Pediococcus</i> , <i>L. fermentum</i>	Cepas puras	Fermentación láctica de granos de yuca y maíz (fufu y ogi).	(Sanni et al., 2013)	Caracterización y propiedades tecnológicas de Bacterias ácido lácticas en la “Sorghurt”, elaborado a base de cereal
Biosilo: <i>Lactococcus lactis</i> Tw34 y <i>Lactobacillus plantarum</i> Lb7	Subproductos de merluza	Inoculación de microorganismos para la fermentación de residuos de	(Marguet et al., 2017)	Biosilo de residuos de merluza y harina de cebada fermentados con bacterias ácido

		merluza y harina de cebada.		lácticas seleccionadas
<i>Lb. delbrueckii</i> , <i>Lb. salivarius</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. reuteri</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. amylovorus</i> and <i>Lb. oris</i> ,	Fideos fermentados de arroz	Preparación de comida tradicional a partir de fermentación de fideos de arroz fresco.	(Li et al., 2015)	Diversidad de bacterias ácido lácticas de fideos de arroz fresco durante el proceso de fermentación, reveladas por métodos de cultivos dependientes e independientes
<i>Lactobacillus acidophilus</i> y <i>Lactobacillus casei</i>	Cepas puras	Elaboración de una bebida fermentada a base de harina de arroz combinada con ajonjolí.	(Hernández-Monzón et al., s. f.)	Desarrollo de una bebida elaborada con harina de arroz y ajonjolí ( <i>Sesamum indicum</i> ) y fermentada con cultivos probióticos

### Métodos de fermentación y antagonismo

A continuación, se expone algunas metodologías relacionadas con la aplicación de las BAL en distintos productos alimenticios elaborados con diferentes propósitos.

Para el trabajo que busca evaluar el efecto antifúngico en pan elaborado y tratado con un biopreservante de *Lactobacillus Plantarum* bajo dos condiciones de almacenamiento, se preparó adecuadamente (Gerez et al., 2015) un biopreservante a partir *Lactobacillus paltarum* del centro de referencia para lactobacillus (CERELA), Tucumán Aragentina, codificado como SL778 y se definió su conservación (4 °C o – 20 °C, usando caldo RMS). El biopreservante fue colocado en una mezcla de harina de trigo, leche descremada en polvo, levadura, sacarosa y agua, dejando fermentar la masa a 37°C por 16 horas, comparativamente con un testigo. De las muestras fermentadas se analizó ácidos orgánicos mediante HPLC (Sistema isocrático con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5mmol/L a un flujo de 0.6 mL/min en una columna Biorad de 30 mm a una temperatura de 45°C), buscando cuantificar ácido láctico y acetato, mediante detector de índice de refracción y ácido fenil acético usando detector UV-210 nm). Se procedió a elaborar pan para determinar en la superficie de rodajas la presencia de hongos en tiempos de siete y catorce días, finalizando con una evaluación sensorial del pan elaborado. Esta metodología tiene la finalidad de involucrar en el proceso de elaboración del pan, la influencia de una bacteria láctica sobre el crecimiento de hongos y la eficacia del biopreservante de *Lactobacillus palntarum*.

La metodología de cultivo dual descrita por Bashan, referido por Tejera es utilizada para estudiar el antagonismo de *Bacillus spp.* sobre hongos fitopatógenos en el cultivo del arroz (*Oryza sativa L.*) (Tejera et al., 2012). Los hongos fitopatógenos se siembran en PDA (OXOID) y se incuban durante siete días a 30 °C. Los aislados bacterianos se sembraron por 24 horas en Caldo Nutritivo en condiciones de agitación en zaranda orbital (150 rpm, 30°C), se ajusta la concentración celular a 10<sup>8</sup> cel/mL basados como referencia en un tubo de 0.5 de la escala Mc Farland para inocular superficialmente por diseminación de 100 µl de esta suspensión bacteriana en placas Petri de 100 mm que contiene medio PDA. Se extrae con un obturador de 5 mm de diámetro un fragmento de hongo crecido y se coloca en el centro de las placas inoculadas con aislados bacterianos, las mismas que se incubarán a 30 °C. La metodología contempla tres réplicas por cada aislado. En un tiempo de 7 a 11 días el efecto antagónico de los aislados bacterianos se determina midiendo el diámetro del crecimiento del hongo fitopatógeno en las placas que contienen el antagonista bacteriano, simultáneamente se ejecutó un control negativo donde se encontraban únicamente los hongos. El cálculo del porcentaje de inhibición se realiza con la ecuación siguiente:

Porcentaje de inhibición = ((D.C.C – D.C.P)/D.C.C) \* 100, dónde:



D.C.C: diámetro de la colonia control.

D.C.P: diámetro de la colonia del hongo en interacción con las bacterias.

Para la bio-desintoxicación de aflatoxinas generadas por *Aspergillus flavus* toxigénico, se aplicó un ensayo invitro utilizando monocultivo y cocultivo de BAL para disminuir la cantidad de aflatoxina B<sub>1</sub> (NF-1) y B<sub>2</sub> (NF-2) en cereales premeditadamente contaminados. La efectividad biodesintoxicante de las BAL se determina mediante parámetros hematológicos y toxicidad en el hígado en ratas albinas. (Ibitoye et al., 2021).

Para la Evaluación del efecto antifúngico de metabolitos de cultivos de bacterias lácticas como bioprotectores, se ejecuta una metodología comenzando con el aislamiento e identificación de especies alterantes, posteriormente se selecciona los cultivos bioprotectores para las pruebas de antagonismo para realizar ensayos con productos celulares bioprotectores elaborados. La capacidad antifúngica de los productos celulares bioprotectores se determinó controlando el crecimiento del hongo alterante (medio agar yogur inoculado con los hongos alterantes), ensayando la inhibición (medio agar yogur adicionado en profundidad con los distintos productos celulares a ensayar e inoculadas con los hongos alterantes) y Controlando la contaminación (medio agar yogur adicionado de los productos a ensayar). (Olivares Tenorio & Klotz Ceberio, 2020).

La posibilidad de inactivar enzimas y en particular la tripsina como también bloquear hipotéticamente reacciones bioquímicas por parte de las BAL se puede apreciar en un estudio existente sobre la capacidad inoculante del formado por *Lactobacillus lactis* TW34 y *Lactobacillus plantarum* Lb7, donde el sustrato para proliferación fue un subproducto de merluza combinado con harina de cebada fermentado por 7 días. La capacidad inoculante del biosilo fue valorada detectando fósforo libre, fracciones proteicas, actividad inhibitoria de tripsina. El Fósforo libre se menciona que fue detectado según la técnica espectrofotométrica descrita por Fiske y Subarow. Las concentraciones de fracciones proteicas aisladas se determinaron con la técnica de o-ftaldialdehído. La actividad inhibitoria de tripsina sobre la caseína bajo la influencia de las muestras de biosilo se midió con la fórmula sugerida por Liu y Markanis, previa inhibición de la tripsina con TCA. (Marguet et al., 2017).

En línea de conseguir BAL para diversas aplicaciones existe un estudio para identificarlas en fideos de arroz fermentados de forma natural utilizados en la alimentación tradicional China, para el aislamiento e identificación de los microorganismos se utilizó la reacción en cadena de la

polimerasa, la electroforesis en gel de gradiente desnaturante (PCR-DGGE- polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis). (Li et al., 2015).

Los granos de cereales dependiendo de las condiciones ambientales siempre estarían predispuestos a ser invadidos por hongos, esta particularidad exige siempre almacenarlos técnicamente para evitar el daño que provocarían ellos. Una alternativa mediata podría considerarse el procesamiento de ellos para genera elaborados alimenticios fermentados, utilizando bacterias lácticas, en este contexto existe un estudio de la elaboración de una bebida fermentada utilizando probióticos a base de arroz y ajonjolí tostado que ha sido evaluada en aceptabilidad, composición nutricional, acidez, pH, viscosidad, calidad microbiológica, viabilidad de los probióticos y estabilidad durante el almacenamiento (Hernández-Monzón et al., s. f.). En la misma línea expresada anteriormente se presenta la opción de otro elaborado conocido como "sorgo" (Sanni et al., 2013) un producto a base de un cereal y tubérculo. Se caracterizan y establecen propiedades tecnológicas de las bacterias ácido lácticas obtenidas de la fermentación de granos de yuca y maíz para fufu y ogi, la identificación se realiza utilizando métodos fenotípicos y genómicos de huellas dactilares como rep-PCR y ARDRA y secuenciación del gen 16S rDNA. Las propiedades tecnológicas consideradas son acidez, producción de peróxido de hidrógeno, hidrólisis del almidón, actividades enzimáticas, degradación de oligosacáridos y propiedades de adherencia *in vitro*. (Sanni et al., 2013).

### Resultados y razonamientos

En la presente revisión se ha podido detectar un sinnúmero de resultados como evidencias en aspectos relacionados con el antagonismo de BAL sobre hongos en cereales y elaborados, fermentación de alimentos frescos y obtención de elaborados probióticos de los mismos, el efecto conservante sobre los alimentos. A continuación, se sintetizan los resultados de los diversos trabajos revisados.

**Tabla 2:** Compendio de resultados de trabajos revisados.

RESULTADOS REPORTADOS	TÍTULO DEL TRABAJO	AUTOR
-----------------------	--------------------	-------

<p>Las aplicaciones reportadas sobre alimentos son:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Uso de BAL en ensilados forrajeros y en ensilaje de pescado.</li> <li>- Bacterias lácticas como probióticos benéficos....</li> <li>- Los efectos benéficos reportados en la salud son:</li> <li>- Mantenimiento de la flora intestinal y tratamiento de problemas digestivos.</li> <li>- Modulación del sistema inmunológico.</li> <li>- Reducción de cáncer de colon.</li> <li>- Usos en intolerancia a la lactosa.</li> <li>- Disminución de colesterol sérico.</li> <li>- Posibles usos en hipertensión.</li> </ul>	<p>Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud.</p>	<p>(Ramírez et al., 2011)</p>
<p>Con relación al papel funcional de las BAL en los alimentos se menciona lo siguiente:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Producción de ácidos orgánicos como: ácido láctico, acetaldehído, ácido propiónico.</li> <li>- Efecto antimicrobiano de peróxido de hidrógeno y bacteriocinas.</li> <li>- Formación de sabores y olores.</li> </ul>	<p>Review. Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos.</p>	<p>(Parra Huertas, 2010)</p>

<ul style="list-style-type: none"> <li>- Producción de endulzantes (manitol, sorbitol).</li> <li>- Producción de vitaminas (complejo B).</li> </ul>		
<p>Se desarrolla un bio-conservante designado como SL778 para utilizarlo en panificados envasados. Se mantiene estable su capacidad antifúngica durante catorce días de almacenamiento a 4 °C o a -20 °C, a pesar de que a los siete días disminuyen los ácidos orgánicos.</p>	<p>2. Cultivo iniciador antifúngico para pan envasado: influencia de dos condiciones de almacenamiento.</p>	<p>(Gerez et al., 2015)</p>
<p>Se utilizaron aislados pertenecientes al género <i>Bacillus</i> para evaluar su efecto antagonico a los siete y once días sobre dos hongos fitopatógenos del cultivo de arroz, determinando el porcentaje de inhibición del crecimiento de los dos hongos. A los siete días se observó el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento in vitro de hongos.</p>	<p>Antagonismo de <i>Bacillus spp.</i> frente a hongos fitopatógenos del cultivo del arroz (<i>Oryza sativa L.</i>).</p>	<p>(Tejera et al., 2012)</p>

<p>Catorce aislados de <i>Bacillus</i> mostraron antagonismo frente a <i>F. oxysporum</i>, se observó que el 64 % de las bacterias de <i>Bacillus</i> presentaron una inhibición del hongo por encima del 80 % a los siete y quince días de incubación, atribuyendo el efecto antagónico a la presencia entre otros de la Subtilina generada por <i>B. subtilis</i>.</p> <p>En un experimento adjunto se ensayó sobre <i>F. moniliforme</i>, observándose un efecto antagónico por parte del 14 % de cepas con un 50% de inhibición.</p> <p>Los resultados muestran un elevado potencial antagónico de los distintos aislados bacterianos sobre <i>F. oxysporum</i> y <i>F. moniliforme</i>, fitopatógenos hortícolas, abriendo la potencialidad de las bacterias lácticas para el control biológico de hongos.</p>	<p>Antagonismo de <i>Bacillus</i> frente a hongos fitopatógenos de cultivos hortícolas.</p>	<p>(Badía et al., 2017)</p>
<p>Las bacterias ácido lácticas pueden biodesintoxicar aflatoxinas, mejorando los efectos toxicológicos y sustentándolos con parámetros hematohistológicos en ratas albinas. Los aislados de BAL inhibieron a <i>A. flavus toxigénico</i>, inhibición sustentada in-vitro al observar una disminución considerable en la cantidad de aflatoxina B1 (AFB1) y</p>	<p>Bacterias del ácido láctico biodesintoxicando aflatoxinas con cereales contaminados, mejoran los efectos toxicológicos y mejoran los parámetros hematohistológicos en ratas albinas.</p>	<p>(Ibitoye et al., 2021)</p>

<p>B2 (AFB2) en mijo y sorgo contaminados tratados con monocultivo y cocultivo de BAL. El efecto tóxico de las aflatoxinas en los hígados de las ratas albinas alimentadas se mejoró con el tratamiento de cereales contaminados con BAL.</p>		
<p>El efecto antifúngico de metabolitos fue evaluado con cultivos bioprotectores sin y con tratamiento térmico en modelos lácteos como agar yogur, observándose un resultado de acuerdo con una escala cualitativa de crecimiento fúngico.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– Cepas de BAL presentaron diferente funcionalidad bioprotectora.</li> <li>– El tratamiento con temperatura eliminó sustancialmente el poder antifúngico.</li> </ul>	<p>Evaluación del efecto antifúngico de metabolitos de cultivos bioprotectores: aplicación en derivados lácteos.</p>	<p>(Olivares Tenorio &amp; Klotz Ceberio, 2020)</p>
<p>Se mencionan como metabolitos antifúngicos a los ácidos grasos 10-OH 18: 1 y el acetato.</p>	<p>Antifungal cultures and metabolites of lactic acid bacteria for use in dairy fermentations</p>	<p>(Liang et al., 2022)</p>
<p>Los dipéptidos cíclicos mencionados con actividad antifúngica son: ciclo (Phe-Leu) y ciclo (Antranilia-Pro, que inhibieron la filamentación de <i>C. albicans</i> al dirigirse a la vía RAS1-cAMP-PKA. Las actividades</p>	<p>Characterization of antifungal cyclic dipeptides of <i>Lactocaseibacillus paracasei</i> ZX1231 and active packaging film prepared with its cell-free supernatant and bacterial nanocellulose</p>	<p>(Zheng et al., 2022)</p>



<p>antifúngicas del SFC (sobrenadante libre de células) elaborado, se combinaron de manera óptima con una matriz de nanocelulosa bacteriana (BNC) para preparar películas bioprotectoras.</p>		
<p>Si bien es cierto las BAL están justificadas en alto grado en su capacidad antifúngica, se observa que plantas superiores pueden permitir formar fungicidas naturales basados en múltiples metabolitos originados de procesos coevolutivos desarrollados como sistemas de defensa frente a hongos.</p>	<p>Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos.</p>	<p>(Montes-Belmont, 2009)</p>
<p>Al caracterizar y establecer propiedades tecnológicas sobre un elaborado a base de cereal (“Sorghurt”), se estableció que la capacidad de producción de ácido es mayor con cepas de <i>Lactobacillus plantarum</i>, seguido de cepas <i>Pediococcus</i> y una producción más lentas de las cepas de <i>L. fermentum</i>. La actividad <math>\beta</math> glucosidasa es mayor para <i>L. Pentosus</i> <i>L. Plantarum</i> y <i>L. fermentum</i>.</p>	<p>Caracterización y propiedades tecnológicas de Bacterias ácido lácticas en la “Sorghurt”, elaborado a base de cereal.</p>	<p>(Sanni et al., 2013)</p>

<p>Se ha determinado la posibilidad de utilizar residuos de merluza y harina de cebada fermentados con BAL determinando la disminución del pH con un crecimiento significativo de bacterias lácticas como <i>Lactococcus lactis</i> y <i>Lactobacillus paltarum</i>, que pueden llegar a cubrir casi la exclusividad de la microbiota del ensilado, provocando la disminución de microorganismos que pueden actuar como patógenos o deteriorantes.</p>	<p>Biosilo de residuos de merluza y harina de cebada fermentados con bacterias ácido lácticas seleccionadas.</p>	<p>(Marguet et al., 2017)</p>
<p>Los fideos de arroz han sido sujetos de investigación durante el proceso de su fermentación consultando la diversidad de bacterias ácido lácticas generadas mediante análisis de secuencias de rRNA 16S con perfiles de electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE).</p>	<p>Diversidad de bacterias ácido lácticas de fideos de arroz fresco durante el proceso de fermentación, reveladas por métodos de cultivos dependientes e independientes.</p>	<p>(Li et al., 2015)</p>
<p>La bebida elaborada con harina de arroz y ajonjolí han mostrado ser adecuadas para fermentación con BAL, pues a distintos tiempos se observa incremento de acidez o disminución de pH acompañado de una buena conservación sustentada en el procedimiento adecuado de formulación y fermentación. Se ha visto una buena conservación hasta 20 días con aceptabilidad considerable.</p>	<p>Desarrollo de una bebida elaborada con harina de arroz y ajonjolí (<i>Sesamum Indicum</i>) y fermentada con cultivos probióticos.</p>	<p>(Hernández-Monzón et al., s. f.)</p>

Resultado que justificaría haber alcanzado un elaborado con características probióticas.		
--	--	--

## Conclusión

La información recabada muestra una importante evidencia de las propiedades antibacterianas y antifúngicas de las bacterias ácido lácticas, atribuidas principalmente a la gran variedad de metabolitos que generan, sin especificarse el mecanismo de acción individual de éstos por lo que se precisan estudios a este nivel.

Existe abundante información sobre el uso de bacterias lácticas como probióticos en la fermentación de sustratos alimenticios y la elaboración de alimentos, en este contexto, una alta variedad de sustratos naturales y elaborados resultarían idóneos para cultivar bacterias lácticas que además de sus propiedades probióticas podrían ser utilizadas como antibacterianas y antifúngicas, lo que les da el carácter de ser promisorias.

## Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo financiero provisto por la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, en el Proyecto “Evaluación invitro de la bioactividad antifúngica y como estimulante del crecimiento vegetal de bacterias ácido lácticas”, ejecutado por el grupo de investigación SAGID.

## Referencias

1. Badía, M. M. R., Castro, D. S., Perdomo, K. R., & Lugo, D. (2017). Antagonismo de Bacillus frente a hongos fitopatógenos de cultivos hortícolas. 32(2), 9.
2. Beristain-Bauza, S. C. (2012). Bacteriocinas: Antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos.
3. Bogantes- Ledezma, P., Bogantes-Ledezma, D., & Bogantes- Ledezma, S. (2004). Aflatoxinas. Acta Médica Costarricense, 46(4), 174-178.

4. Drouin, P., Tremblay, J., da Silva, É. B., & Apper, E. (2022). Changes to the microbiome of alfalfa during the growing season and after ensiling with *Lentilactobacillus buchneri* and *Lentilactobacillus hilgardii* inoculant. *Journal of Applied Microbiology*, 133(4), 2331-2347. <https://doi.org/10.1111/jam.15641>
5. Gerez, C. L., Fornaguera, M. J., Obregozo, M. D., de Valdez, G. F., & Torino, M. I. (2015). Antifungal starter culture for packed bread: Influence of two storage conditions. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(2), 118-124.
6. Hernández-Monzón, D. C. A., Madernás-Sánchez, L. D., Pérez-Argüelles, L. R., Trujillo-Pérez, T. G., González-Góngora, I., & Díaz-Abreu, D. C. J. (s. f.). Desarrollo de una bebida elaborada con harina de arroz y ajonjolí (*Sesamum Indicum*) y fermentada con cultivos probióticos. 16.
7. Holzapel, W., & Wood, B. (2014). *Lactic acid bacteria: Biodiversity and taxonomy* (ed. (S.I)). Wiley. [https://elibro.net/es/lc/epoch/titulos/187855?fs\\_q=lactic\\_\\_acid\\_\\_bacteria&prev=fs](https://elibro.net/es/lc/epoch/titulos/187855?fs_q=lactic__acid__bacteria&prev=fs)
8. Ibitoye, O. A., Olaniyi, O. O., Ogidi, C. O., & Akinyele, B. J. (2021). Lactic acid bacteria bio-detoxified aflatoxins contaminated cereals, ameliorate toxicological effects and improve haemato-histological parameters in albino rats. *Toxin Reviews*, 40(4), 985-996. <https://doi.org/10.1080/15569543.2020.1817088>
9. Li, Y., Zheng, X.-W., Chen, J.-Y., Liang, J.-F., Yu, S.-Z., & Han, B.-Z. (2015). Lactic acid bacteria diversity of fresh rice noodles during the fermentation process, revealed by culture-dependent and culture-independent methods. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29(5), 915-920. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1051494>
10. Liang, N., Zhao, Z., Curtis, J. M., & Gänzle, M. G. (2022). Antifungal cultures and metabolites of lactic acid bacteria for use in dairy fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 383, 109938. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109938>
11. Marguet, E., Vallejo, M., Schulman, G., Ibañez, C., Ledesma, P., & Parada, R. (2017). Biosilo de residuos de merluza y harina de cebada fermentados con bacterias ácido lácticas seleccionadas. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 15(2), 112. [https://doi.org/10.18684/BSAA\(15\)112-120](https://doi.org/10.18684/BSAA(15)112-120)
12. Montes-Belmont, R. (2009). Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos. 6.

13. Olivares Tenorio, M. L., & Klotz Ceberio, B. (2020). Evaluación del efecto antifúngico de metabolitos de cultivos bioprotectores: Aplicación en derivados lácteos. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 18(2), 15. [https://doi.org/10.18684/BSAA\(18\)15-25](https://doi.org/10.18684/BSAA(18)15-25)
14. Parra Huertas, R. A. (2010, junio). Review. bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1692-35612010000100012](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612010000100012)
15. Pérez-y-Terrón, R., Gonzalez-Montfort, T. S., & Muñoz-Rojas, J. (s. f.). Antagonismo microbiano asociado a cepas bacterianas provenientes de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) y maíz (*Zea Mays*). 1(3).
16. Petkova, M., Gotcheva, V., Dimova, M., Bartkiene, E., Rocha, J. M., & Angelov, A. (2022). Screening of *Lactiplantibacillus plantarum* Strains from Sourdoughs for Biosuppression of *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae* and *Botrytis cinerea* in Table Grapes. *Microorganisms*, 10(11). Scopus. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10112094>
17. Preciado, G. M., EscalanteMinakata, P., Castro, J. A. O., Junquera, V. I., Chávez, J. A. M., González, C. N. A., & Herrera, R. R. (2013). Bacteriocinas: Características y aplicación en alimentos.
18. Ramírez, J. C. R., Ulloa, P. R., Velázquez, M. Y., Ulloa, J. A., & Romero, F. A. (2011). Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. 7, 16.
19. Ramírez Ramírez, J. C., Rosas Ullo, Petra, Velázquez González, Martha Yanira, Ulloa, J. A., & Arce Romero, F. (2011, junio). Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. 2011. <http://fuente.uan.edu.mx/publicaciones/03-07/1.pdf>
20. Ribes, S., Fuentes, A., Talens, P., & Barat, J. M. (2018). Prevention of fungal spoilage in food products using natural compounds: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(12), 2002-2016. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1295017>
21. Sanni, A., Franz, C., Schillinger, U., Huch, M., Guigas, C., & Holzapfel, W. (2013). Characterization and Technological Properties of Lactic Acid Bacteria in the Production of “Sorghurt,” a Cereal-Based Product. *Food Biotechnology*, 27(2), 178-198. <https://doi.org/10.1080/08905436.2013.781949>
22. Sun, H., Liao, C., Lu, G., Zheng, Y., Cheng, Q., Xie, Y., Wang, C., Chen, C., & Li, P. (2022). Role of *Lactiplantibacillus paraplantarum* during anaerobic storage of ear-removed

- corn on biogas production. *Bioresource Technology*, 364. Scopus. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128061>
23. Tejera, B., Heydrich, M., & Rojas, M. M. (2012). Antagonismo de *Bacillus* spp. Frente a hongos fitopatógenos del cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). 27(2), 6.
24. Waters, D. M., Mauch, A., Coffey, A., Arendt, E. K., & Zannini, E. (2015). Lactic Acid Bacteria as a Cell Factory for the Delivery of Functional Biomolecules and Ingredients in Cereal-Based Beverages: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(4), 503-520. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.660251>
25. Zheng, X., Nie, W., Xu, J., Zhang, H., Liang, X., & Chen, Z. (2022). Characterization of antifungal cyclic dipeptides of *Lacticaseibacillus paracasei* ZX1231 and active packaging film prepared with its cell-free supernatant and bacterial nanocellulose. *Food Research International*, 162. Scopus. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112024>

© 2023 por los autores. Este artículo es de acceso abierto y distribuido según los términos y condiciones de la licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional (CC BY-NC-SA 4.0) (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>).