

Artículo

Respuesta agronómica de plántulas de *Theobroma cacao* L. a concentraciones de kéfir de agua fermentado

Agronomic response of Theobroma cacao L. seedlings to fermented water kefir concentrations

Mercedes Susana Carranza-Patiño ^{1*}, Aracely Isabel Tomalá Beltrán ², Lady Gissela Sellan Marcillo ³, Robinson J. Herrera-Feijoo ⁴ y Karen Nathali Ceballos Peñafiel ⁵

¹ Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ), Quevedo, Los Ríos, Ecuador; <https://orcid.org/0000-0002-0917-0415>

² Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UTEQ, Quevedo, Los Ríos, Ecuador; <https://orcid.org/0009-0005-1840-0007>; atomalab@uteq.edu.ec

³ Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UTEQ, Quevedo, Los Ríos, Ecuador; <https://orcid.org/0009-0003-3183-7954>; lsellanm@uteq.edu.ec

⁴ Facultad de Ciencias Pecuarias, UTEQ, Quevedo, Los Ríos, Ecuador; <https://orcid.org/0000-0003-3205-2350>; rherreraf2@uteq.edu.ec

⁵ Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH), Riobamba, Chimborazo, Ecuador; <https://orcid.org/0009-0001-7616-3653>; natthi.ceballos@gmail.com

Cita: Carranza-Patiño, M. S., Tomalá Beltrán, A. I., Sellan Marcillo, L. G., Herrera-Feijoo, R. J., & Ceballos Peñafiel, K. N. (2026). Respuesta agronómica de plántulas de *Theobroma cacao* L. a concentraciones de kéfir de agua fermentado. *Multidisciplinary Collaborative Journal*, 4(4), 43-60. <https://doi.org/10.70881/mcj/v4/n4/183>

Recibido: 12/08/2026

Revisado: 03/10/2026

Aceptado: 09/10/2026

Publicado: 14/10/2026



Copyright: © 2026 por los autores. Este artículo es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos y condiciones de la [Licencia Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/), Atribución-NoComercial 4.0 Internacional. (CC BY-NC).

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

* Correspondencia: mcarranza@uteq.edu.ec



<https://doi.org/10.70881/mcj/v4/n4/183>

Resumen: Los bioinsumos microbianos requieren validación dosis–respuesta antes de su recomendación agronómica. En consecuencia, se evaluó la respuesta de plántulas de *Theobroma cacao* L., procedentes de progenies de polinización libre de un lote antiguo de cacao Nacional, frente a kéfir de agua fermentado aplicado al sustrato. Se empleó un diseño completamente al azar con T0 = 0, T1 = 5, T2 = 25 y T3 = 50 mL L⁻¹, cuatro repeticiones y cuatro plantas por repetición (64 plantas). Se aplicaron por drench 5 mL por plántula en cuatro aplicaciones semanales. Altura y diámetro se midieron a los 15, 30 y 45 días; hojas, a los 30 y 45; y al final, variables radicales y de biomasa. Las mediciones repetidas se analizaron con modelos lineales mixtos y las variables finales con ANOVA y Tukey ($\alpha = 0,05$). La altura mostró efectos de tratamiento ($p = 0,0306$) y tiempo ($p < 0,001$), sin interacción; el diámetro presentó interacción tratamiento $\times$ tiempo ($p = 0,0203$). El número de raíces ($p = 0,0118$), el peso seco radical ($p = 0,0060$) y el peso seco aéreo ($p = 0,0120$) difirieron entre tratamientos, con superioridad del testigo. Por tanto, el fermentado no ejerció bioestimulación.

Palabras clave: bioinsumos; cacao; kéfir de agua; biomasa radical; vivero.

Abstract: Microbial bioinputs require dose–response validation before agronomic recommendation. Accordingly, the response of *Theobroma cacao* L. seedlings, obtained from open-pollinated progenies of an old Nacional cacao plot, to fermented water kefir applied to the substrate was evaluated. A completely randomized design was used with T0 = 0, T1 = 5, T2 = 25 and T3 = 50 mL L⁻¹, four replicates and four plants per replicate (64 plants). Solutions were applied as a substrate drench at 5 mL per seedling in four weekly applications. Height and stem diameter were measured at 15, 30 and 45 days; leaf number at 30 and 45 days; and root and biomass traits at the final evaluation. Repeated measurements were analyzed using linear mixed models, whereas final variables were analyzed by ANOVA and Tukey's test ($\alpha = 0.05$). Height

showed treatment ($p = 0.0306$) and time effects ($p < 0.001$), without interaction; stem diameter showed a treatment $\times$ time interaction ($p = 0.0203$). Root number ($p = 0.0118$), root dry mass ($p = 0.0060$) and shoot dry mass ($p = 0.0120$) differed among treatments, with the control being superior. Therefore, the ferment did not exert biostimulation.

Keywords: bioinputs; cacao; water kefir; root biomass; nursery.

1. Introducción

El cacao (*Theobroma cacao* L.) constituye un cultivo estratégico para los sistemas agroproductivos tropicales y, en particular, para la economía agrícola del litoral ecuatoriano. En este contexto, la obtención de plantas vigorosas en vivero representa una fase crítica, dado que condiciona el prendimiento y el desarrollo posterior en campo. Ahora bien, la calidad de una plántula no depende exclusivamente de la elongación del tallo, sino que integra el crecimiento aéreo, el diámetro, la formación de hojas, el desarrollo radical y la acumulación de materia seca. Por esta razón, los estudios de bioinsumos en vivero deben combinar indicadores morfológicos temporales con variables destructivas evaluadas al final del periodo experimental (Carranza Patiño et al., 2025).

Antes de examinar la evidencia disponible, conviene precisar el marco conceptual. De acuerdo con du Jardin (2015), un bioestimulante vegetal es toda sustancia o microorganismo aplicado a las plantas con el propósito de mejorar la eficiencia nutricional, la tolerancia al estrés abiótico o los atributos de calidad del cultivo, con independencia de su contenido de nutrientes (p. 3). Esta definición resulta operativamente relevante, puesto que un producto solo puede denominarse bioestimulante cuando su efecto ha sido demostrado experimentalmente. En efecto, Rouphael y Colla (2020) subrayan que el tránsito desde los datos experimentales hasta la aplicación práctica exige ensayos dosis–respuesta y condiciones de uso claramente documentadas.

Asimismo, la evidencia sobre inoculantes microbianos muestra un panorama heterogéneo. Backer et al. (2018) sistematizan los mecanismos de promoción del crecimiento asociados a rizobacterias, mientras que Santoyo et al. (2021) documentan que los consorcios microbianos pueden superar el desempeño de las cepas individuales cuando existe complementariedad funcional. No obstante, Kumari et al. (2023) advierten que la condición de bioestimulante no es intrínseca al origen biológico del insumo y que su empleo requiere una evaluación explícita de riesgos. De manera complementaria, Lamont et al. (2017) señalan que las bacterias ácido-lácticas poseen un potencial de aplicación agrícola aún poco explorado, aunque su contribución depende de la cepa, del hospedero y del contexto edáfico; por consiguiente, la presencia de bacterias ácido-lácticas en un producto fermentado no permite anticipar un efecto promotor.

En cacao, los antecedentes disponibles confirman esa variabilidad. Victoria y Aggangan (2023) compararon fertilizantes biológicos y químicos en plántulas y registraron respuestas diferenciales en crecimiento y población microbiana del

suelo, en tanto que Djenatou et al. (2020) evaluaron la inoculación con hongos micorrízicos arbusculares en vivero. En el contexto ecuatoriano, León Donoso et al. (2023) aplicaron microorganismos fijadores de nitrógeno en mudas de cacao, mientras que Carranza Patiño et al. (2025) evaluaron *Trichoderma* spp. bajo distintos sustratos y Carranza-Patiño et al. (2026) analizaron la combinación de sustratos orgánicos e inoculación con *Pseudomonas*. En conjunto, estos trabajos respaldan el interés por los bioinsumos, pero también evidencian que la respuesta depende de la combinación microorganismo–formulación–sustrato y que no puede asumirse un efecto positivo universal.

Por otra parte, el kéfir de agua constituye un ecosistema fermentativo complejo cuya composición no es constante. Gultiz et al. (2011) identificaron una comunidad dominada por *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Acetobacter*, acompañada de diversas levaduras, y comprobaron que la proporción de estos grupos varía según el origen de los gránulos. Del mismo modo, Laureys y De Vuyst (2014) determinaron que los metabolitos mayoritarios de la fermentación son el etanol y el ácido láctico, con producción menor de glicerol, ácido acético y manitol, y que el pH desciende desde 4,26 hasta 3,45 durante las primeras 72 h. En la misma línea, Laureys et al. (2021) demostraron que el tipo y la concentración del inóculo, el sustrato y la disponibilidad de oxígeno modifican la cinética fermentativa; Zannini et al. (2023) confirmaron el efecto del sustrato sobre la composición microbiana cultivable; y las revisiones de Lynch et al. (2021) y Bozkır et al. (2024) coinciden en que la ausencia de cultivos iniciadores definidos limita la reproducibilidad del producto. Por tanto, un fermentado no caracterizado microbiológica y químicamente no puede considerarse un insumo de composición constante.

A partir de lo anterior, cabe considerar también la hipótesis inversa a la bioestimulación. Diversos estudios clásicos y recientes documentan que los ácidos orgánicos de cadena corta inhiben la elongación radical: Rao y Mikkelsen (1977) observaron reducción del crecimiento y de la absorción de fósforo y potasio en arroz; Lynch (1980) determinó que la toxicidad del ácido acético aumenta a pH bajo; Janovicek et al. (1997) reportaron respuestas negativas tempranas en maíz; y Masserano et al. (2022) confirmaron que la raíz es más sensible que el vástago en una evaluación dosis–respuesta. En términos mecanísticos, Allen y Allen (2020) demostraron que la fracción no disociada del ácido acético, favorecida a pH ácido, explica la inhibición del crecimiento radical, por lo que cualquier afirmación bioestimulante sobre este compuesto debe excluir previamente el daño radicular. En consecuencia, un fermentado ácido aplicado al sustrato podría producir efectos neutros o desfavorables, y no necesariamente promotores.

El vacío abordado por este trabajo se sitúa, específicamente, en la limitada evidencia experimental sobre kéfir de agua fermentado aplicado directamente al sustrato de plántulas de cacao mediante una evaluación dosis–respuesta. Por

consiguiente, el objetivo fue evaluar la respuesta agronómica de plántulas de *T. cacao* a cuatro concentraciones de kéfir de agua fermentado bajo condiciones de vivero. Se planteó como hipótesis que al menos una concentración produciría una respuesta diferente respecto del testigo en variables aéreas, radicales o de biomasa.

2. Materiales y Métodos

2.1. Localización, material vegetal y condiciones de vivero

El ensayo se desarrolló entre junio y julio de 2026 en instalaciones de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ), Quevedo, Ecuador, bajo condiciones semicontroladas de vivero con malla sombra de 70 %. Los laboratorios de la UTEQ se localizan en la zona UTM 17M, coordenadas 666603,19 m E y 9880503,75 m N, a aproximadamente 70 m s. n. m. (1°04'50,71" S; 79°30'09,68" O). Durante el periodo experimental, la temperatura media del invernadero fue de aproximadamente 24 °C.

El material vegetal se obtuvo de mazorcas provenientes de plantas clonales establecidas en un lote antiguo de cacao Nacional. Dado que el lote contenía una mezcla de materiales clonales y las mazorcas se originaron bajo condiciones de polinización libre, las semillas utilizadas correspondieron a progenies de polinización abierta y no a un clon o variedad genética única. Se seleccionaron preferentemente semillas de la región central de las mazorcas.

Posteriormente, las semillas se desinfectaron superficialmente con etanol al 70 % durante 1 min y, a continuación, con una solución preparada con 20 mL de hipoclorito comercial al 5 % y 80 mL de agua durante 3 min, equivalente aproximadamente a 1 % de hipoclorito en la solución final. Finalmente, se realizaron enjuagues con agua destilada estéril, se removió el mucílago y las semillas se dispusieron sobre papel absorbente humedecido con agua destilada para la pregerminación.

2.2. Sustrato, recipientes y manejo hídrico

Se utilizaron vasos plásticos previamente acondicionados con orificios en la base para facilitar el drenaje. Cada recipiente recibió 300 g de una mezcla homogénea compuesta por 150 g de tierra obtenida de un área sembrada con guaba, 75 g de turba y 75 g de arena, equivalentes a 50, 25 y 25 % en base a masa, respectivamente. El riego se realizó según las necesidades hídricas del cultivo, manteniendo un manejo uniforme entre las unidades experimentales y aplicando aproximadamente 50 mL de agua por plántula en cada evento. Para el riego se utilizó agua de pozo profundo de la finca experimental La María.

2.3. Preparación del kéfir de agua

El fermentado se preparó con aproximadamente 125 g de gránulos de kéfir de agua y 22 g de panela como fuente de carbono. La panela se disolvió en 400 mL

de agua y, seguidamente, se incorporaron los gránulos. La mezcla se mantuvo durante 24 h a temperatura ambiente en un recipiente de vidrio cubierto con papel toalla, lo que permitió el intercambio gaseoso. Finalizada la fermentación, se utilizó la fracción líquida como concentrado original para preparar las soluciones de tratamiento.

Las cuatro aplicaciones semanales se prepararon a partir de un mismo lote de fermentación, de modo que la identidad del material aplicado se mantuvo constante durante todo el ensayo. El pH se verificó antes de las aplicaciones; una medición documentada registró pH 4,439 a 23,3 °C. Cabe precisar que no se cuantificaron la carga microbiana, los ácidos orgánicos, el etanol ni la conductividad eléctrica del fermentado, limitación que se retoma en la discusión.

2.4. Tratamientos y aplicaciones

Se evaluaron cuatro tratamientos: T0 = 0, T1 = 5, T2 = 25 y T3 = 50 mL L⁻¹ de fermentado (Tabla 1). Para preparar 100 mL de solución, T1 se obtuvo tomando 0,5 mL del fermentado original y enrasando con agua hasta 100 mL; T2 se preparó con 2,5 mL y T3 con 5,0 mL, igualmente enrasados a 100 mL. El tratamiento T0 recibió agua sin fermentado.

De cada solución se aplicaron 5 mL por plántula mediante drench, con una frecuencia de una aplicación cada siete días, para un total de cuatro aplicaciones. La primera aplicación se realizó el día 15, inmediatamente después de registrar la medición correspondiente a esa fecha; en consecuencia, los valores de los 15 días constituyen la línea basal previa a la exposición al fermentado, mientras que las mediciones de los 30 y 45 días corresponden a plántulas ya tratadas.

Tabla 1
Composición de las soluciones de tratamiento y dosis aplicada por plántula

Tratamiento	Fermentado (mL)	Volumen final (mL)	Concentración (mL L ⁻¹)	Aplicación por planta (mL)
T0	0,0	100	0	5
T1	0,5	100	5	5
T2	2,5	100	25	5
T3	5,0	100	50	5

Nota. Cada tratamiento se aplicó por drench una vez cada siete días, para un total de cuatro aplicaciones.

2.5. Diseño experimental y aleatorización

Se utilizó un diseño completamente al azar con cuatro tratamientos y cuatro repeticiones. Las plantas se identificaron y la asignación de los tratamientos a las unidades experimentales, así como su ubicación dentro del invernadero, se determinaron por sorteo manual sin reposición. La matriz final contiene cuatro plantas por repetición, equivalentes a 16 plantas por tratamiento y 64 plantas en total. Las plantas individuales se consideraron submuestras y la repetición constituyó la unidad experimental. En consecuencia, para las variables finales se promediaron las cuatro plantas de cada combinación tratamiento × repetición antes de la inferencia, con el fin de evitar la pseudorreplicación.

2.6. Manejo sanitario

Durante el ensayo se observó presencia incidental de insectos, incluidos pulgones y otros fitófagos. Como medida de manejo se aplicó jabón neutro diluido en agua destilada sobre el envés de las hojas y, posteriormente, se enjuagaron las plántulas para retirar residuos; además, se colocaron trampas para reducir la incidencia de insectos.

La cal utilizada como medida sanitaria se aplicó exclusivamente sobre el piso del invernadero y sobre las tablas o mesones donde se encontraban los recipientes, sin contacto con las plantas ni con el sustrato experimental. Cabe aclarar que estas medidas no formaron parte de los tratamientos experimentales.

2.7. Variables evaluadas y determinación de biomasa

La altura (cm) y el diámetro del tallo (mm) se registraron a los 15, 30 y 45 días. El número de hojas se registró a los 30 y 45 días. En la evaluación final se determinaron el número de raíces, el peso húmedo de raíz, el peso húmedo aéreo, el volumen de agua desplazado, el peso seco de raíz y el peso seco aéreo. Para la determinación de biomasa seca, el material radical y aéreo se secó durante 24 h a 60 °C. No se presentan área foliar, longitud radical ni número de hojas a los 15 días, dado que estas variables no constan de forma completa en la matriz analítica final.

2.8. Análisis estadístico

La altura, el diámetro y el número de hojas se analizaron mediante modelos lineales mixtos, con tratamiento, tiempo y la interacción tratamiento × tiempo como efectos fijos y la unidad experimental como efecto aleatorio. Como análisis complementario se realizaron ANOVA por fecha.

Las variables finales se analizaron mediante ANOVA de una vía sobre las medias de las unidades experimentales ($n = 4$ por tratamiento); dichas medias se calcularon sobre las plantas con registro disponible dentro de cada combinación tratamiento × repetición.

Se evaluaron la normalidad de residuos mediante la prueba de Shapiro–Wilk y la homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Levene. Ante significancia del ANOVA se aplicó la prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$). Cuando la prueba de Levene indicó heterogeneidad de varianzas, la variable se analizó mediante el ANOVA de Welch, robusto a esa violación, con la prueba de Games-Howell como comparación múltiple. Se estimó η^2 para las variables finales como medida descriptiva del tamaño del efecto y se calcularon intervalos de confianza del 95 % para las diferencias respecto del testigo mediante el procedimiento de Tukey. Todos los análisis se ejecutaron en el entorno estadístico R (R Core Team) mediante la interfaz RStudio, versión 2026.06.0+242.

3. Resultados

3.1. Altura de la plántula

La altura aumentó en todos los tratamientos a lo largo del periodo evaluado (Tabla 2 y Figura 1). El modelo mixto mostró efecto de tratamiento ($p = 0,0306$) y de tiempo ($p < 0,001$), sin interacción tratamiento $\times$ tiempo ($p = 0,3823$). Sin embargo, el ANOVA por fecha mostró diferencias a los 15 días ($p = 0,0318$) y no a los 30 ($p = 0,1356$) ni a los 45 días ($p = 0,5405$).

Dado que la medición de los 15 días precedió a la primera aplicación, esas diferencias corresponden a heterogeneidad basal entre unidades experimentales y no a un efecto del fermentado. Por ello, la significancia global del tratamiento en el modelo mixto debe interpretarse con cautela: refleja en buena medida el desnivel de partida, que se atenuó progresivamente hasta desaparecer a los 45 días.

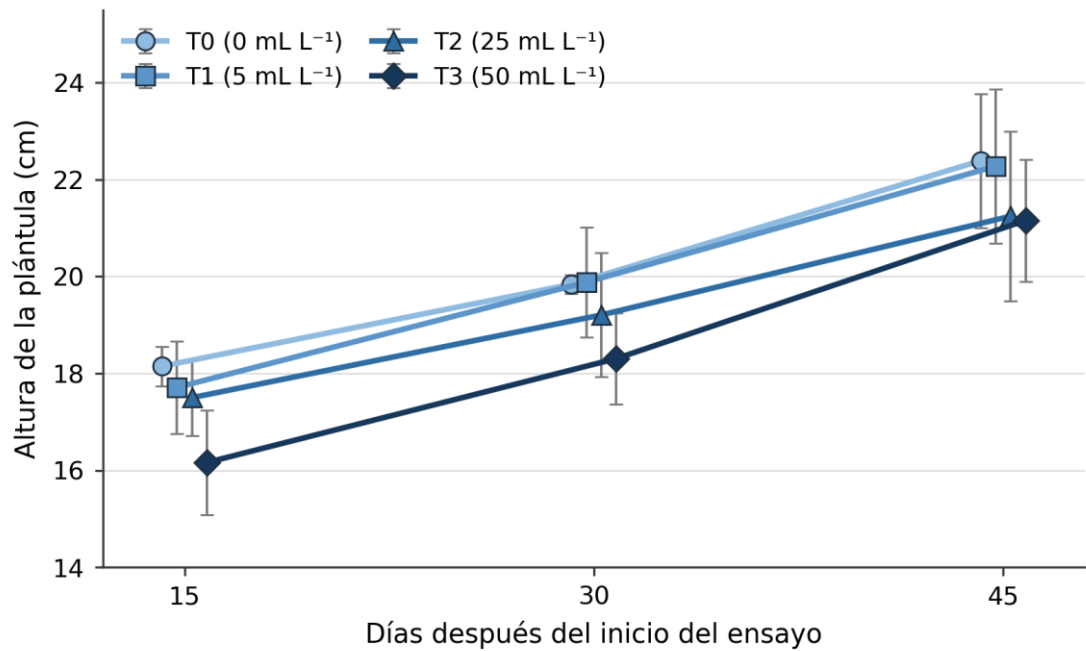
Tabla 2
Altura (cm) de plántulas de Theobroma cacao L. a los 15, 30 y 45 días según tratamiento

Tratamiento	15 días	30 días	45 días
T0	18,15 $\pm$ 0,41	19,84 $\pm$ 0,20	22,39 $\pm$ 1,38
T1	17,71 $\pm$ 0,95	19,88 $\pm$ 1,14	22,28 $\pm$ 1,59
T2	17,50 $\pm$ 0,78	19,21 $\pm$ 1,28	21,24 $\pm$ 1,75
T3	16,16 $\pm$ 1,08	18,31 $\pm$ 0,95	21,16 $\pm$ 1,26

Nota. Media $\pm$ desviación estándar de cuatro unidades experimentales. Modelo mixto: tratamiento $p = 0,0306$; tiempo $p < 0,001$; interacción $p = 0,3823$.

Figura 1

Trayectoria temporal de la altura de plántulas de Theobroma cacao L. según la concentración de kéfir de agua fermentado



Nota. Media $\pm$ desviación estándar de cuatro unidades experimentales por tratamiento ($n = 4$). Los puntos se desplazaron ligeramente sobre el eje horizontal para evitar el solapamiento de las barras de error. Modelo lineal mixto: tratamiento $p = 0,0306$; tiempo $p < 0,001$; interacción tratamiento $\times$ tiempo $p = 0,3823$.

3.2. Diámetro del tallo

El diámetro del tallo aumentó con el tiempo en todos los tratamientos (Tabla 3 y Figura 2). No se detectó efecto global de tratamiento ($p = 0,7480$), pero sí efecto de tiempo ($p < 0,001$) e interacción tratamiento $\times$ tiempo ($p = 0,0203$). Los análisis por fecha no detectaron diferencias a los 15 ($p = 0,8139$), 30 ($p = 0,1911$) ni 45 días ($p = 0,0956$), lo que indica diferencias de trayectoria sin separación consistente en una fecha concreta.

Tabla 3

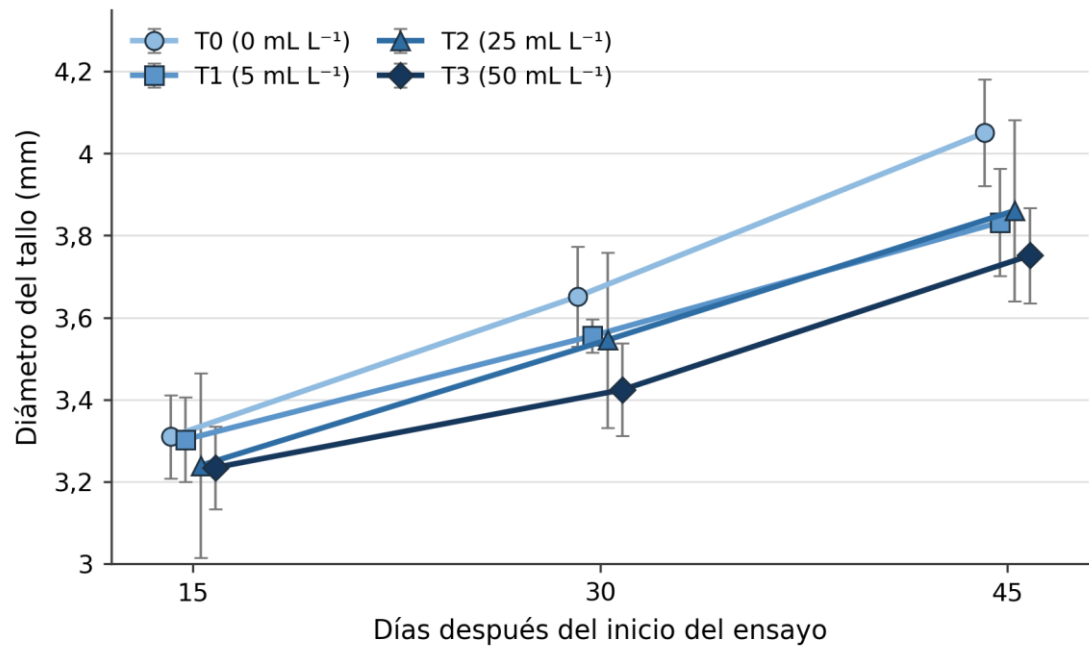
Diámetro del tallo (mm) a los 15, 30 y 45 días según tratamiento

Tratamiento	15 días	30 días	45 días
T0	3,310 $\pm$ 0,102	3,652 $\pm$ 0,122	4,051 $\pm$ 0,130
T1	3,303 $\pm$ 0,103	3,556 $\pm$ 0,041	3,832 $\pm$ 0,131
T2	3,240 $\pm$ 0,225	3,546 $\pm$ 0,213	3,861 $\pm$ 0,221
T3	3,235 $\pm$ 0,101	3,424 $\pm$ 0,113	3,751 $\pm$ 0,117

Nota. Media $\pm$ desviación estándar de cuatro unidades experimentales. Modelo mixto: tratamiento $p = 0,7480$; tiempo $p < 0,001$; interacción $p = 0,0203$.

Figura 2

Trayectoria temporal del diámetro del tallo según la concentración de kéfir de agua fermentado



Nota. Media $\pm$ desviación estándar de cuatro unidades experimentales por tratamiento ($n = 4$). Modelo lineal mixto: tratamiento $p = 0,7480$; tiempo $p < 0,001$; interacción tratamiento $\times$ tiempo $p = 0,0203$. La significancia de la interacción refleja diferencias de trayectoria y no una separación entre tratamientos en una fecha concreta.

3.3. Número de hojas

El número de hojas aumentó de los 30 a los 45 días (Tabla 4 y Figura 3). El modelo mixto mostró efecto del tiempo ($p < 0,001$), sin efecto de tratamiento ($p = 0,9249$) ni interacción significativa al 5 % ($p = 0,0874$). De manera coincidente, los ANOVA por fecha tampoco detectaron diferencias a los 30 ($p = 0,9503$) ni a los 45 días ($p = 0,5266$).

Tabla 4

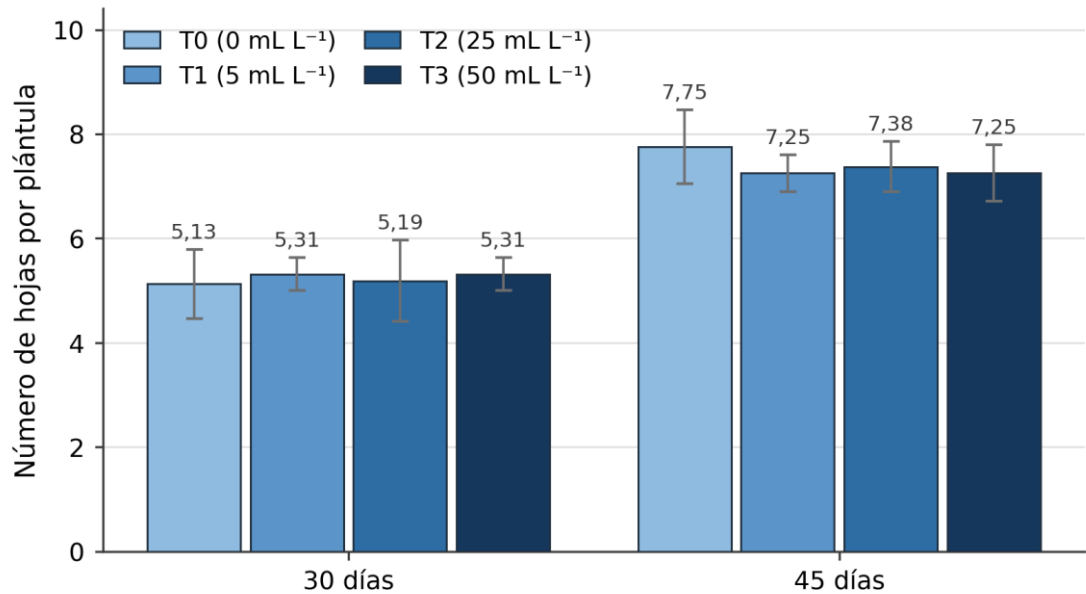
Número de hojas a los 30 y 45 días según tratamiento

Tratamiento	30 días	45 días
T0	5,13 $\pm$ 0,66	7,75 $\pm$ 0,71
T1	5,31 $\pm$ 0,32	7,25 $\pm$ 0,35
T2	5,19 $\pm$ 0,77	7,38 $\pm$ 0,48
T3	5,31 $\pm$ 0,32	7,25 $\pm$ 0,54

Nota. Media $\pm$ desviación estándar de cuatro unidades experimentales. Modelo mixto: tratamiento $p = 0,9249$; tiempo $p < 0,001$; interacción $p = 0,0874$.

Figura 3

Número de hojas por plántula a los 30 y 45 días según tratamiento



Nota. Media $\pm$ desviación estándar de cuatro unidades experimentales por tratamiento ($n = 4$). Modelo lineal mixto: tratamiento $p = 0,9249$; tiempo $p < 0,001$; interacción $p = 0,0874$. No se detectaron diferencias entre tratamientos en ninguna de las dos fechas.

3.4. Sistema radical y biomasa

El número de raíces difirió entre tratamientos ($p = 0,0118$; $\eta^2 = 0,587$) y la prueba de Tukey identificó un mayor valor en T0 que en T2 (p ajustado = 0,0080). El peso seco radical presentó diferencias ($p = 0,0060$; $\eta^2 = 0,632$): T0 superó a T1 ($p = 0,0489$), T2 ($p = 0,0095$) y T3 ($p = 0,0097$). Del mismo modo, el peso seco aéreo difirió entre tratamientos ($p = 0,0120$; $\eta^2 = 0,585$): T0 superó a T2 ($p = 0,0217$) y T3 ($p = 0,0163$), mientras que T1 presentó un valor intermedio y no se separó del testigo ($p = 0,0665$). En el peso húmedo aéreo, la prueba de Levene detectó heterogeneidad de varianzas ($p = 0,0041$), por lo que la variable se analizó mediante el ANOVA de Welch: a diferencia del ANOVA convencional ($p = 0,0912$), la prueba robusta reveló diferencias entre tratamientos ($F = 11,06$; $gl = 3$; $6,14$; $p = 0,0069$), y Games-Howell separó a T0 de T1 ($p = 0,0041$), sin diferencias frente a T2 y T3, cuya dispersión fue mayor. Los valores medios se presentan en la Tabla 5, y las diferencias entre tratamientos, con la agrupación derivada de la prueba de Tukey, se ilustran en las Figuras 4 y 5.

Tabla 5

Variables radiculares y de biomasa al final del periodo experimental

Variable	T0	T1	T2	T3	p	η^2
N.º de raíces	6,00 $\pm$ 1,17	4,19 $\pm$ 0,90	3,31 $\pm$ 1,01	4,23 $\pm$ 0,62	0,0118	0,587

Raíz húmeda (g)	1,719 ± 0,184	1,284 ± 0,131	1,250 ± 0,233	1,284 ± 0,414	0,0786	0,420
Aérea húmeda (g) a	5,961 ± 0,254	4,931 ± 0,232	4,565 ± 1,278	4,710 ± 0,769	0,0069	0,405
Volumen de agua (mL)	0,950 ± 0,071	1,169 ± 0,455	0,766 ± 0,272	1,125 ± 0,433	0,3712	0,222
Raíz seca (g)	0,506 ± 0,041	0,369 ± 0,041	0,326 ± 0,094	0,326 ± 0,068	0,0060	0,632
Aérea seca (g)	1,933 ± 0,433	1,404 ± 0,090	1,282 ± 0,285	1,251 ± 0,092	0,0120	0,585

Nota. Media ± desviación estándar de cuatro unidades experimentales (n = 4). Salvo indicación contraria, el valor de p corresponde al ANOVA de una vía y η^2 es una medida descriptiva del tamaño del efecto. ^a Para el peso húmedo aéreo, la prueba de Levene indicó heterogeneidad de varianzas (p = 0,0041), por lo que se reporta el ANOVA de Welch (F = 11,06; gl = 3; 6,14; p = 0,0069); el ANOVA convencional no habría detectado diferencias (p = 0,0912) y la prueba de Games-Howell separó a T0 de T1 (p = 0,0041).

Con el fin de dimensionar la magnitud y la precisión de las diferencias, la Tabla 6 presenta los contrastes de cada concentración respecto del testigo con sus intervalos de confianza del 95 %.

Tabla 6

Diferencias de cada concentración respecto del testigo, con intervalos de confianza del 95 %

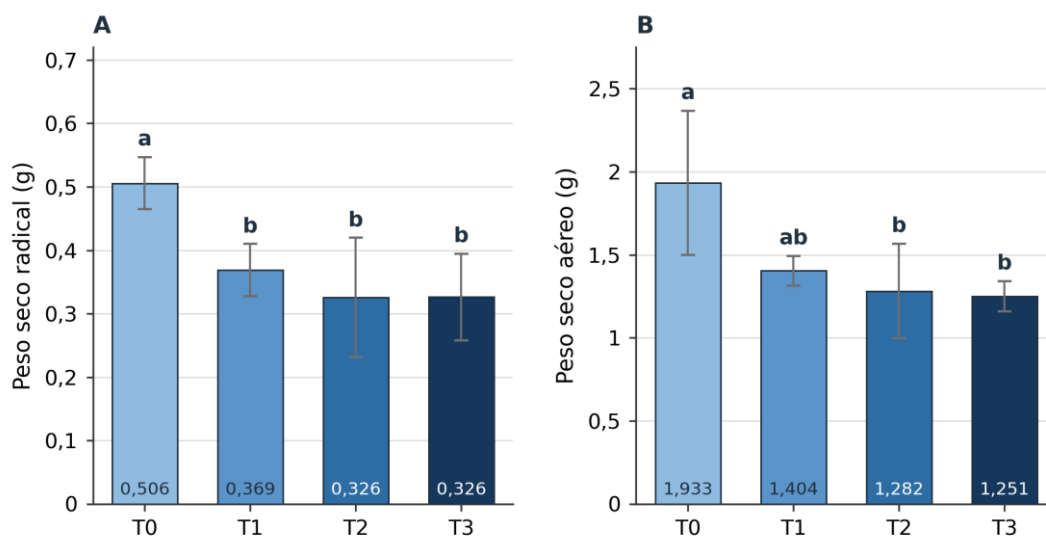
Variable	Contraste	Diferencia	IC 95 %	p ajustado
N.º de raíces	T1 – T0	-1,81	[-3,80; 0,17]	0,0781
	T2 – T0	-2,69	[-4,67; -0,70]	0,0080
	T3 – T0	-1,77	[-3,76; 0,22]	0,0867
Raíz seca (g)	T1 – T0	-0,137	[-0,273; -0,001]	0,0489
	T2 – T0	-0,180	[-0,316; -0,043]	0,0095
	T3 – T0	-0,179	[-0,316; -0,043]	0,0097
Aérea seca (g)	T1 – T0	-0,529	[-1,090; 0,031]	0,0665
	T2 – T0	-0,651	[-1,212; -0,090]	0,0217
	T3 – T0	-0,682	[-1,243; -0,121]	0,0163

Nota. Diferencias estimadas sobre las medias de las unidades experimentales (n = 4 por tratamiento). Un valor negativo indica un promedio inferior al del testigo. Los intervalos y los

valores de p provienen del procedimiento de Tukey ($\alpha = 0,05$); un intervalo que excluye el cero corresponde a una diferencia estadísticamente significativa.

Figura 4

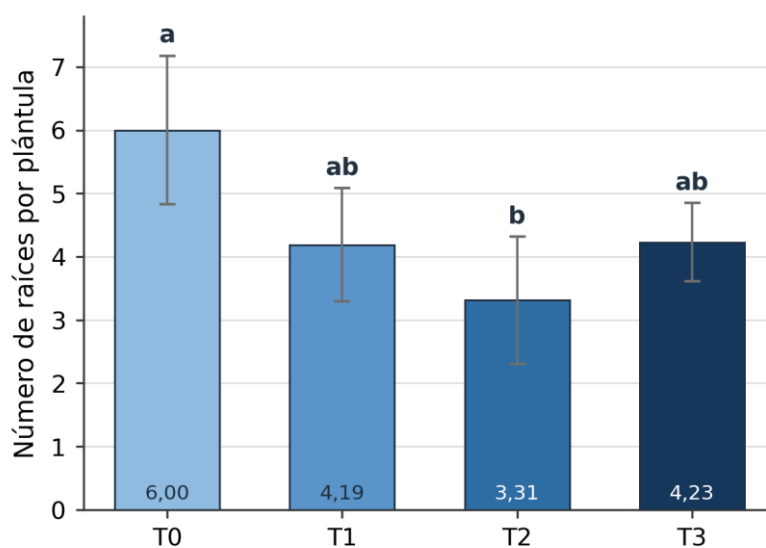
Peso seco radical (A) y peso seco aéreo (B) al final del periodo experimental según tratamiento



Nota. Media $\pm$ desviación estándar de cuatro unidades experimentales por tratamiento ($n = 4$). Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$). Peso seco radical: $p = 0,0060$, $\eta^2 = 0,632$. Peso seco aéreo: $p = 0,0120$, $\eta^2 = 0,585$. La intensidad del color representa la concentración creciente del fermentado.

Figura 5

Número de raíces por plántula al final del periodo experimental según tratamiento



Nota. Media $\pm$ desviación estándar de cuatro unidades experimentales por tratamiento ($n = 4$). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$); ANOVA $p = 0,0118$, $\eta^2 = 0,587$. La única diferencia detectada correspondió al contraste T0–T2 (p ajustado = 0,0080).

4. Discusión

Los resultados no respaldan un efecto bioestimulante general del kéfir de agua fermentado bajo las condiciones evaluadas. Mientras que la altura, el diámetro y el número de hojas estuvieron dominados principalmente por la evolución temporal, las variables destructivas revelaron una menor acumulación de biomasa en los tratamientos fermentados. Esta divergencia resulta metodológicamente relevante, puesto que muestra la importancia de no inferir la calidad de la plántula únicamente a partir de la altura o de la apariencia aérea. En términos de du Jardin (2015), el producto evaluado no satisface el criterio funcional que define a un bioestimulante, dado que no mejoró la eficiencia nutricional ni los atributos de calidad de la planta.

Estos hallazgos contrastan con los estudios en los que se utilizaron formulaciones microbianas específicamente seleccionadas para la promoción del crecimiento. Victoria y Aggangan (2023) evaluaron fertilizantes biológicos y químicos en plántulas de cacao; Djenatou et al. (2020) estudiaron la inoculación micorrízica; y Carranza Patiño et al. (2025) documentaron respuestas favorables con *Trichoderma* spp. bajo determinados sustratos. Ahora bien, tales diferencias resultan plausibles porque el término bioinsumo agrupa formulaciones biológicamente distintas y no constituye, por sí mismo, evidencia de eficacia. En esta línea, Santoyo et al. (2021) precisan que el desempeño de un consorcio depende de la complementariedad funcional entre sus integrantes, condición que no está garantizada en un consorcio fermentativo seleccionado por criterios alimentarios y no agronómicos.

El peso seco radical constituyó la señal experimental más consistente. En efecto, el testigo alcanzó 0,506 g, frente a 0,369, 0,326 y 0,326 g en T1, T2 y T3, respectivamente (Figura 4A). El tamaño del efecto fue elevado ($\eta^2 = 0,632$) y las tres concentraciones difirieron del testigo, con reducciones de 0,137 g en T1 y de aproximadamente 0,180 g en T2 y T3, cuyos intervalos de confianza del 95 % excluyen el cero (Tabla 6). No obstante, la amplitud de esos intervalos, coherente con $n = 4$, aconseja leer las magnitudes como estimaciones preliminares. A su vez, T2 presentó un menor número de raíces que T0 (Figura 5). Este patrón es compatible con una respuesta radicular desfavorable al fermentado en las condiciones del ensayo, aunque no permite identificar el mecanismo responsable.

El peso seco aéreo mostró un patrón concordante, ya que T0 fue superior a T2 y T3 (Figura 4B). En cambio, T1 presentó una respuesta intermedia y no se separó estadísticamente del testigo. Este resultado no demuestra equivalencia ni estimulación a 5 mL L⁻¹, pero sugiere que la magnitud de la respuesta desfavorable fue menor en la concentración baja. Por consiguiente, una fase posterior debería explorar concentraciones inferiores a 5 mL L⁻¹ e incrementar el número de unidades experimentales independientes.

Desde una perspectiva microbiológica y bioquímica, la composición del fermentado ofrece hipótesis explicativas que este ensayo no puede confirmar. Laureys y De Vuyst (2014) determinaron que los metabolitos mayoritarios del kéfir de agua son el etanol y el ácido láctico, acompañados de glicerol, ácido acético y manitol, y que el pH desciende marcadamente durante las primeras horas de fermentación. Asimismo, Laureys et al. (2021) demostraron que la concentración del inóculo y las condiciones del proceso modifican la cinética y la generación de metabolitos, mientras que Zannini et al. (2023) y Lynch et al. (2021) documentan la variabilidad composicional asociada al sustrato y al origen de los gránulos. El pH ácido registrado en este estudio (4,439) confirma una característica del fermentado; sin embargo, no permite atribuir la respuesta vegetal a la acidez, dado que las soluciones se aplicaron diluidas y en volúmenes reducidos.

Con las reservas anteriores, la literatura sobre ácidos orgánicos de cadena corta ofrece un marco interpretativo plausible. Rao y Mikkelsen (1977) documentaron reducción de la elongación radical y de la absorción de fósforo y potasio en arroz; Lynch (1980) estableció que la toxicidad del ácido acético se incrementa a pH bajo; y Masserano et al. (2022) confirmaron que la raíz responde antes que el vástago en ensayos dosis–respuesta. De modo más específico, Allen y Allen (2020) demostraron que la inhibición del crecimiento radical depende de la fracción no disociada del ácido acético y que la capacidad tampón del sustrato puede atenuarla, razón por la cual toda afirmación bioestimulante sobre este compuesto debe excluir previamente el daño radicular. En este ensayo, no obstante, no se cuantificaron ácidos orgánicos, etanol, conductividad eléctrica, bacterias ácido-lácticas ni levaduras, ni se realizó un seguimiento fisicoquímico del sustrato; por tanto, los mecanismos posibles permanecen como hipótesis y no como conclusiones.

Conviene además precisar la interpretación de las variables aéreas. El efecto global de tratamiento observado para la altura no debe interpretarse como una respuesta favorable al kéfir, porque las diferencias ya estaban presentes en la primera evaluación y desaparecieron al final del periodo, tal como se aprecia en la convergencia de las trayectorias de la Figura 1. En cuanto al diámetro, la interacción tratamiento $\times$ tiempo fue significativa, aunque ninguna fecha aislada mostró diferencias al 5 %, lo que apunta a diferencias de trayectoria y no a una ventaja final claramente atribuible a los tratamientos.

La variabilidad genética del material vegetal constituye otra condición relevante. Las semillas procedieron de progenies de polinización libre de un lote con mezcla de clones de cacao Nacional, por lo que no representan un genotipo uniforme. Si bien la aleatorización contribuyó a distribuir esa variabilidad entre tratamientos, futuros experimentos podrían utilizar material clonal o familias identificadas con el fin de reducir la heterogeneidad genética y aumentar la potencia estadística.

En términos aplicados, la evidencia disponible no justifica recomendar 25 o 50 mL L⁻¹ de kéfir de agua fermentado como bioestimulante de plántulas de cacao. Este resultado es coherente con la advertencia de Kumari et al. (2023) sobre la necesidad de evaluar riesgos antes de promover inoculantes microbianos, así como con el énfasis de Rouphael y Colla (2020) en la validación experimental previa a la recomendación práctica. La contribución del estudio reside, por tanto, en proporcionar una evaluación dosis–respuesta inicial y en mostrar que un consorcio fermentativo no seleccionado específicamente para la promoción vegetal puede generar respuestas distintas de las observadas con inoculantes formulados (Backer et al., 2018; Lamont et al., 2017).

4.1. Limitaciones y líneas futuras

Las principales limitaciones del estudio fueron el número reducido de unidades experimentales independientes (cuatro por tratamiento), la utilización de progenies de polinización libre genéticamente heterogéneas, la ausencia de caracterización microbiológica y metabólica del fermentado y la falta de un seguimiento fisicoquímico completo del sustrato. Asimismo, la presencia incidental de insectos requirió manejo sanitario durante el ensayo. En consecuencia, se recomienda que futuros estudios aumenten la replicación, incorporen un gradiente de dosis por debajo de 5 mL L⁻¹ y cuantifiquen bacterias ácido-lácticas, levaduras, ácidos orgánicos, etanol, conductividad eléctrica y pH del sustrato, siguiendo los procedimientos analíticos descritos para este tipo de fermentados (Laureys y De Vuyst, 2014; Bozkır et al., 2024).

5. Conclusiones

El kéfir de agua fermentado no produjo un efecto bioestimulante general en plántulas de *T. cacao* bajo las condiciones evaluadas. Las concentraciones estudiadas no generaron ventajas finales en altura ni en número de hojas. El diámetro presentó diferencias en su trayectoria temporal, pero no una separación entre tratamientos en fechas individuales. La respuesta más consistente se observó en la biomasa: el testigo presentó mayor peso seco radical que T1, T2 y T3, mayor número de raíces que T2 y mayor peso seco aéreo que T2 y T3. En consecuencia, las concentraciones de 25 y 50 mL L⁻¹ no deben recomendarse como dosis bioestimulantes bajo estas condiciones. El tratamiento T1 mostró un impacto menor, aunque sin superioridad frente al testigo. Por último, futuros ensayos deberían evaluar concentraciones inferiores, utilizar material vegetal genéticamente más homogéneo, incrementar el número de unidades experimentales y caracterizar microbiológica y químicamente tanto el fermentado como el sustrato.

Contribución de los autores: Conceptualización: M.S.C.P. Metodología: M.S.C.P. y A.I.T.B. Software: M.S.C.P. Validación: M.S.C.P. Análisis formal: M.S.C.P. Investigación: M.S.C.P., A.I.T.B., L.G.S.M., R.J.H.F. y K.N.C.P. Recursos: M.S.C.P., A.I.T.B., L.G.S.M., R.J.H.F. y K.N.C.P. Curación de datos:

M.S.C.P. y K.N.C.P. Redacción del borrador original: M.S.C.P. Redacción (revisión y edición): M.S.C.P., A.I.T.B. y L.G.S.M. Visualización: M.S.C.P., A.I.T.B., R.J.H.F. y K.N.C.P. Supervisión: M.S.C.P., A.I.T.B. y L.G.S.M. Todos los autores han leído y aceptado la versión publicada del manuscrito.

Financiamiento: Esta investigación no ha recibido financiación externa.

Agradecimientos: Los autores expresan su sincero agradecimiento a la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ) y a la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales por el apoyo institucional brindado. Asimismo, reconocen la valiosa colaboración de los estudiantes de octavo semestre de la carrera de Agronomía, cuya disposición y compromiso con la innovación educativa contribuyeron a la recolección de los datos y al desarrollo de esta investigación.

Declaración de disponibilidad de datos: Los datos están disponibles previa solicitud a los autores de correspondencia: mcarranza@uteq.edu.ec

Conflicto de Intereses: Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses que pudiera haber influido en el diseño, ejecución o resultados del presente estudio.

Referencias Bibliográficas

- Allen, M. M., & Allen, D. J. (2020). Biostimulant potential of acetic acid under drought stress is confounded by pH-dependent root growth inhibition. *Frontiers in Plant Science*, 11, 647. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00647>
- Backer, R., Rokem, J. S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., Subramanian, S., & Smith, D. L. (2018). Plant growth-promoting rhizobacteria: Context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1473. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01473>
- Bozkır, E., Yilmaz, B., Sharma, H., Esatbeyoglu, T., & Ozogul, F. (2024). Challenges in water kefir production and limitations in human consumption: A comprehensive review of current knowledge. *Heliyon*, 10(13), e33501. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e33501>
- Carranza Patiño, M. S., Rivera Castillo, V. C., Marín Cuevas, C. V., Torres Rodríguez, J. A., & Cedeño Moreira, A. V. (2025). *Trichoderma* spp. en la propagación sostenible de *Theobroma cacao* L. bajo distintos sustratos. *Multidisciplinary Collaborative Journal*, 3(2), 92–113. <https://doi.org/10.70881/mcj/v3/n2/52>
- Carranza Patiño, M. S., Rivera-Castillo, V., Herrera-Feijoo, R. J., & Palma-Zambrano, J. (2026). *Theobroma cacao* L. seedling response to organic substrates and *Pseudomonas* inoculation under nursery conditions. *Multidisciplinary Collaborative Journal*, 4(2), 102–119. <https://doi.org/10.70881/mcj/v4/n2/154>

- Djenatou, P., Ngoh Dooh, J. P., Philippe, K., & Ngonkeu Mangaptche, E. L. (2020). Evaluation of the inoculation effect of arbuscular mycorrhizal fungi on the growth of cocoa seedlings (*Theobroma cacao* L.) in the nursery. *International Journal of Sciences*, 9(7), 6–13. <https://doi.org/10.18483/ijSci.2352>
- du Jardin, P. (2015). Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*, 196, 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>
- Gulitz, A., Stadie, J., Wenning, M., Ehrmann, M. A., & Vogel, R. F. (2011). The microbial diversity of water kefir. *International Journal of Food Microbiology*, 151(3), 284–288. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.09.016>
- Janovicek, K. J., Vyn, T. J., Voroney, R. P., & Allen, O. B. (1997). Early corn seedling growth response to acetic, propionic and butyric acids. *Canadian Journal of Plant Science*, 77(3), 333–337. <https://doi.org/10.4141/P96-122>
- Kumari, M., Swarupa, P., Kesari, K. K., & Kumar, A. (2023). Microbial inoculants as plant biostimulants: A review on risk status. *Life*, 13(1), 12. <https://doi.org/10.3390/life13010012>
- Lamont, J. R., Wilkins, O., Bywater-Ekegård, M., & Smith, D. L. (2017). From yogurt to yield: Potential applications of lactic acid bacteria in plant production. *Soil Biology and Biochemistry*, 111, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.03.015>
- Laureys, D., & De Vuyst, L. (2014). Microbial species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of water kefir fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(8), 2564–2572. <https://doi.org/10.1128/AEM.03978-13>
- Laureys, D., Leroy, F., Hauffman, T., Raes, M., Aerts, M., Vandamme, P., & De Vuyst, L. (2021). The type and concentration of inoculum and substrate as well as the presence of oxygen impact the water kefir fermentation process. *Frontiers in Microbiology*, 12, 628599. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.628599>
- León Donoso, J. A., Terán Ostaíza, B. M., Torres García, Á. R., & Ayala Bajaña, V. (2023). Aplicação de microrganismos fixadores de nitrogênio biológico no crescimento de mudas de cacau (*Theobroma cacao*) em condições de viveiro. *Brazilian Journal of Animal and Environmental Research*, 6(1), 871–885. <https://doi.org/10.34188/bjaerv6n1-077>
- Lynch, J. M. (1980). Effects of organic acids on the germination of seeds and growth of seedlings. *Plant, Cell & Environment*, 3(4), 255–259. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1980.tb00798.x>
- Lynch, K. M., Wilkinson, S., Daenen, L., & Arendt, E. K. (2021). An update on water kefir: Microbiology, composition and production. *International Journal*

of Food Microbiology, 345, 109128.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109128>

Masserano, G., Moretti, B., Bertora, C., Vidotto, F., Monaco, S., Vocino, F., Vamerali, T., & Sacco, D. (2022). Acetic acid disturbs rice germination and post-germination under controlled conditions mimicking green mulching in flooded paddy. *Italian Journal of Agronomy*, 17(1), 1926.
<https://doi.org/10.4081/ija.2022.1926>

Rao, D. N., & Mikkelsen, D. S. (1977). Effects of acetic, propionic, and butyric acids on rice seedling growth and nutrition. *Plant and Soil*, 47(2), 323–334.
<https://doi.org/10.1007/BF00011491>

Rouphael, Y., & Colla, G. (2020). Toward a sustainable agriculture through plant biostimulants: From experimental data to practical applications. *Agronomy*, 10(10), 1461. <https://doi.org/10.3390/agronomy10101461>

Santoyo, G., Guzmán-Guzmán, P., Parra-Cota, F. I., Santos-Villalobos, S. de los, Orozco-Mosqueda, M. del C., & Glick, B. R. (2021). Plant growth stimulation by microbial consortia. *Agronomy*, 11(2), 219.
<https://doi.org/10.3390/agronomy11020219>

Victoria, K. S., & Aggangan, N. S. (2023). Effects of bio- and chemical fertilizers on growth and soil microbial population of cacao (*Theobroma cacao* L.) seedlings. *Philippine Journal of Science*, 152(4), 1495–1505.
<https://doi.org/10.56899/152.04.18>

Zannini, E., Lynch, K. M., Nyhan, L., Sahin, A. W., O'Riordan, P., Daenen, L., & Arendt, E. K. (2023). Influence of substrate on the fermentation characteristics and culture-dependent microbial composition of water kefir. *Fermentation*, 9(1), 28. <https://doi.org/10.3390/fermentation9010028>