Multidisciplinary Collaborative Journal
ISSN: 3073-1356

DOSO EDITORIAL CIENTÍFICA

Artículo

Caracterización preliminar de dos fermentos de kéfir de agua después de cinco días

Preliminary characterization of two water kefir fermentations after five days

Cristian Fernando Izquierdo-Velasco [1], Mercedes Susana Carranza-Patiño [2*], Patricia Cecibel Villa Zambrano [3], José Xavier Serrano-Recalde [4] y Robinson J. Herrera-Feijoo [5]

[1] Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Quevedo, Ecuador; https://orcid.org/0009-0004-4088-2607; cizquierdov2@uteq.edu.ec

[2] Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Quevedo, Ecuador; https://orcid.org/0000-0002-0917-0415

[3] Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Quevedo, Ecuador; https://orcid.org/0009-0003-6665-6686; pvillaz@uteq.edu.ec

[4] Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Quevedo, Ecuador; https://orcid.org/0009-0001-6774-2805; josexaviersr14@gmail.com

[5] Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Facultad de Ciencias Pecuarias, Quevedo, Ecuador; https://orcid.org/0000-0003-3205-2350; rherreraf2@uteq.edu.ec

* Correspondencia: mcarranza@uteq.edu.ec

Cita: Izquierdo-Velasco, C. F., Carranza-Patiño, M. S., Villa Zambrano, P. C., Serrano-Recalde, J. X., & Herrera-Feijoo, R. J. (2026). Caracterización preliminar de dos fermentos de kéfir de agua después de cinco días. *Multidisciplinary Collaborative Journal*, *4*(4), 95-113. https://doi.org/10.70881/mcj/v4/n4/186

Recibido: 04/09/2026
Revisado: 14/10/2026
Aceptado: 20/10/2026
Publicado: 09/11/2026

https://doi.org/10.70881/mcj/v4/n4/186

Copyright: © 2026 por los autores. Este artículo es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos y condiciones de la Licencia Creative Commons, Atribución-NoComercial 4.0 Internacional. (**CC BY-NC**).

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

Resumen: El kéfir de agua es un sistema fermentativo formado por comunidades de bacterias y levaduras cuya composición depende del inóculo y de las condiciones de fermentación. El objetivo fue caracterizar preliminarmente las propiedades fisicoquímicas, microbiológicas cultivables, microscópicas y fenotípicas de dos fermentos independientes preparados a partir de un mismo lote de gránulos. Cada unidad se preparó con 40 g de gránulos, 30 g de panela comercial amarilla y 1 L de agua embotellada, y se evaluó después de cinco días. En M1 y M2 se determinaron pH y sólidos solubles mediante tres lecturas técnicas por muestra; además, se evaluaron crecimiento en un medio nutritivo de formulación propia, morfología por tinción de Gram, actividad catalasa y respuesta metabólica exploratoria en medio con almidón y azul de bromotimol. M1 presentó pH 4,19 y 0,4 °Brix, y M2 pH 4,14 y 0,6 °Brix. Ambas muestras mostraron crecimiento cultivable. En el material cultivado se observaron morfotipos bacilares y cocobacilares, estructuras compatibles con levaduras y una reacción compatible con actividad catalasa. El medio con almidón mostró cambios de color compatibles con modificación del pH. Estos datos constituyen una línea base del fermento para ensayos posteriores con más unidades de fermentación y métodos moleculares.

Palabras clave: fermentación no láctea; bacterias ácido-lácticas; levaduras; panela; tinción de Gram.

Abstract: Water kefir is a fermentation system composed of bacterial and yeast communities whose composition depends on the inoculum and fermentation conditions. This study preliminarily characterized the

physicochemical, culture-based microbiological, microscopic, and phenotypic properties of two independent fermentations prepared from the same batch of water kefir grains. Each unit contained 40 g of grains, 30 g of commercial yellow panela, and 1 L of bottled water and was evaluated after five days. In M1 and M2, pH and soluble solids were determined from three technical readings per sample; growth on a laboratory-formulated nutrient medium, morphology by Gram staining, catalase activity, and an exploratory metabolic response in a starch medium containing bromothymol blue were also evaluated. M1 showed pH 4.19 and 0.4 °Brix, whereas M2 showed pH 4.14 and 0.6 °Brix. Both samples exhibited cultivable growth. Bacillary and coccobacillary morphotypes, structures compatible with yeast cells, and a reaction consistent with catalase activity were observed in the cultured material. The starch-containing medium showed color changes compatible with pH modification. These data provide a baseline of the ferment for further studies with more fermentation units and molecular methods.

Keywords: non-dairy fermentation; lactic acid bacteria; yeasts; panela; Gram staining.

1. Introducción

Los alimentos y las bebidas fermentados constituyen sistemas biológicos en los que la transformación del sustrato depende de comunidades microbianas complejas y de sus interacciones metabólicas, razón por la cual sus propiedades no pueden explicarse únicamente a partir de la materia prima empleada, sino también de la dinámica de los microorganismos que intervienen en el proceso (Tamang et al., 2016). Dentro de este grupo, el kéfir de agua es una bebida fermentada no láctea que se obtiene al incubar gránulos translúcidos en una solución azucarada, los cuales albergan una comunidad simbiótica de bacterias y levaduras inmersa en una matriz de exopolisacáridos sintetizados a partir de la sacarosa disponible en el medio (Fiorda et al., 2017; Lynch et al., 2021). Entre los grupos microbianos descritos con mayor frecuencia en estos gránulos se encuentran las bacterias ácido-lácticas, las levaduras y las bacterias ácido-acéticas, aunque su abundancia relativa y la identidad de las especies dominantes varían de manera considerable entre cultivos de distinta procedencia y entre condiciones de elaboración (Gulitz et al., 2011; Pendón et al., 2022). De igual modo, el aislamiento de bacterias ácido-lácticas productoras de dextrano a partir de gránulos de kéfir de agua confirma que una fracción relevante de la comunidad es capaz de sintetizar exopolisacáridos a partir de sacarosa, propiedad que sustenta la formación de la matriz del gránulo y su mantenimiento como inóculo reutilizable (Davidović et al., 2015).

Los gránulos de kéfir de agua funcionan como un consorcio microbiano en el que diferentes poblaciones participan de forma coordinada en la utilización de los carbohidratos y en la formación de metabolitos como etanol, ácido láctico, ácido acético, glicerol, manitol y dióxido de carbono, cuya acumulación determina la acidez y las características de la bebida (Laureys & De Vuyst, 2014; Lynch et al., 2021). Esta organización responde a interacciones tróficas de tipo mutualista,

puesto que las levaduras liberan aminoácidos y vitaminas que favorecen el crecimiento de los lactobacilos, mientras que la acidificación generada por estos últimos crea condiciones favorables para determinadas levaduras del consorcio (Stadie et al., 2013). Por consiguiente, las propiedades de la bebida resultante dependen no solo de la presencia de determinados grupos microbianos, sino también del origen del inóculo, que condiciona la cinética fermentativa y las características del producto obtenido con gránulos de diferente procedencia (Laureys & De Vuyst, 2017). A ello se suma que factores operativos como la disponibilidad de oxígeno y de nutrientes, la capacidad tampón y el contenido de calcio del agua, el tiempo de retroinoculación y la temperatura de incubación modifican el desarrollo de la fermentación y la diversidad de especies presentes (Laureys et al., 2018, 2019, 2022).

El sustrato azucarado constituye otra fuente de variación, ya que la sustitución de la sacarosa refinada por fuentes no convencionales, como azúcares mínimamente procesados, frutas o extractos vegetales, modifica la acidificación, el consumo de azúcares y las características microbiológicas del fermento obtenido (Gökırmaklı et al., 2023; Lima et al., 2024; Tavares et al., 2023). En este sentido, la panela o azúcar no centrifugado de caña conserva, además de la sacarosa predominante, pequeñas proporciones de glucosa y fructosa junto con compuestos fenólicos, flavonoides, minerales y vitaminas, cuya presencia la distingue del azúcar refinado como medio de fermentación (Alarcón et al., 2021; Jaffé, 2015). En consecuencia, los valores de pH y de sólidos solubles obtenidos con un edulcorante determinado no pueden extrapolarse a otros sustratos, dado que el tipo y la concentración del azúcar, junto con la relación entre inóculo y sustrato, modifican el perfil fisicoquímico y la cinética de la fermentación (Laureys et al., 2021; Lima et al., 2024). Asimismo, la temperatura de incubación y las propiedades del agua empleada influyen en los parámetros fisicoquímicos y sensoriales del producto final, de modo que la caracterización de un fermento debe referirse siempre a las condiciones concretas bajo las cuales fue elaborado y mantenido (Laureys et al., 2022; Tireki, 2025).

La variabilidad entre cultivos representa un aspecto central para la caracterización del kéfir de agua, puesto que el análisis de muestras procedentes de diferentes fuentes ha revelado comunidades microbianas distintas, y los estudios metagenómicos han evidenciado una diversidad que no puede resolverse mediante rasgos macroscópicos o microscópicos (Marsh et al., 2013; Verce et al., 2019). Del mismo modo, las aproximaciones basadas en secuenciación y en enfoques multiómicos han documentado cambios en la composición microbiana durante la fermentación y diferencias entre microbiomas de distinto origen, lo que pone de manifiesto procesos de selección ecológica no observables mediante cultivo convencional (Arrieta-Echeverri et al., 2023; Garmendia et al., 2026; Wilches-López et al., 2023). Por esta razón, los resultados obtenidos mediante cultivo, tinción y pruebas fenotípicas deben interpretarse según el nivel de resolución de dichas técnicas, ya que los medios

de cultivo recuperan solo una parte de la diversidad microbiana presente y pueden omitir microorganismos no cultivables con funciones relevantes en el proceso (Amann et al., 1995; Tamang et al., 2016). En particular, la tinción de Gram permite describir la morfología celular y la respuesta diferencial de la envoltura celular, pero su resultado puede variar con la edad del cultivo y con la ejecución del procedimiento, por lo que no sustituye a los métodos específicos de identificación taxonómica (Beveridge, 2001).

En Ecuador, Monar et al. (2014) caracterizaron kéfir de agua artesanal elaborado con distintos endulzantes y tiempos de fermentación mediante variables químicas y microbiológicas, y su trabajo constituye un antecedente regional que demuestra la utilidad de integrar ambos tipos de indicadores en la descripción de estos fermentos. No obstante, las características de un fermento particular dependen de su formulación, de su inóculo y de las condiciones de procesamiento, por lo que los resultados obtenidos en un sistema no pueden transferirse directamente a otros cultivos ni a otros sustratos, como advierten las revisiones sobre la variabilidad del kéfir de agua (Lynch et al., 2021; Pendón et al., 2022). Por otra parte, los fermentados que contienen bacterias ácido-lácticas se han utilizado en sistemas agrícolas para mejorar el suelo, controlar enfermedades y promover el crecimiento vegetal, aunque las funciones de estos microorganismos en el fitomicrobioma y la consistencia de sus efectos aún requieren validación experimental (Lamont et al., 2017; Raman et al., 2022). En esa línea, la aplicación de sobrenadantes de kéfir lácteo en plantas de frijol y de pepino bajo condiciones controladas incrementó algunos parámetros de crecimiento aéreo y radical, lo que sugiere un potencial agronómico de los productos derivados del kéfir que exige conocer previamente las características del fermento aplicado (Taşkın & Akköprü, 2020).

En este contexto, nuestro grupo emplea fermentos de kéfir de agua elaborados con panela en ensayos con plántulas de cacao y de tomate, de manera que conocer su acidez, su contenido de sólidos solubles y los grupos microbianos cultivables en el momento de su uso constituye un requisito para interpretar las respuestas vegetales, dado que la composición de estos fermentos no es constante (Laureys et al., 2021; Lynch et al., 2021). La novedad del presente trabajo radica en que proporciona una línea base fisicoquímica, microbiológica y fenotípica de un fermento de kéfir de agua de origen ecuatoriano preparado con panela comercial, sustrato menos documentado que la sacarosa refinada y que otros edulcorantes alternativos evaluados en la literatura (Lima et al., 2024; Monar et al., 2014; Tavares et al., 2023). Su relevancia reside en que esta información permite trazar el fermento que posteriormente se aplica como insumo experimental en plantas, en coherencia con la necesidad de caracterizar los productos fermentados con bacterias ácido-lácticas antes de atribuirles efectos sobre el crecimiento vegetal (Lamont et al., 2017; Raman et al., 2022). Asimismo, una caracterización que integre variables fisicoquímicas, crecimiento cultivable, observación microscópica y respuestas fenotípicas orienta la

necesidad posterior de recuentos validados, aislamiento de cepas y herramientas moleculares, que son las que ofrecen resolución taxonómica y funcional en este tipo de consorcios (Arrieta-Echeverri et al., 2023; Verce et al., 2019). Por consiguiente, el objetivo de este estudio fue caracterizar de forma preliminar las propiedades fisicoquímicas, microbiológicas cultivables, microscópicas y fenotípicas de dos fermentos de kéfir de agua, preparados a partir de un mismo lote de inóculo y evaluados después de cinco días bajo condiciones similares de laboratorio.

2. Materiales y métodos

2.1. Diseño y alcance del estudio

Se realizó un estudio descriptivo y exploratorio orientado a la caracterización preliminar de dos fermentos de kéfir de agua. Los gránulos procedieron de la provincia de Los Ríos, Ecuador, y se mantuvieron en frascos de vidrio bajo un mismo sistema de conservación. M1 y M2 correspondieron a dos unidades de fermentación independientes, preparadas con gránulos procedentes del mismo lote de inóculo y evaluadas al quinto día.

Los dos frascos se consideraron repeticiones biológicas de una misma condición de fermentación. M1 y M2 no representaron tiempos diferentes ni mediciones sucesivas de un mismo recipiente. Las tres lecturas efectuadas para cada variable fisicoquímica fueron repeticiones técnicas y no unidades experimentales adicionales.

El número limitado de unidades experimentales definió el alcance descriptivo del estudio. Por esta razón, no se aplicaron pruebas de inferencia estadística ni se formularon comparaciones destinadas a establecer diferencias significativas entre M1 y M2.

2.2. Condiciones de mantenimiento y fermentación

Los gránulos de kéfir de agua se conservaron en frascos de vidrio y el medio de mantenimiento se renovó cada cinco días. Cada unidad de fermentación se preparó de manera independiente con 40 g de gránulos, 30 g de panela comercial amarilla y 1 L de agua embotellada, equivalentes a 40 g/L de gránulos y 30 g/L de panela. Los recipientes se ubicaron en estantes del laboratorio a una temperatura ambiente aproximada de 24–26 °C, se protegieron de la luz directa con cartón oscuro y se cubrieron con papel absorbente, sin cierre hermético.

Los dos frascos se mantuvieron bajo las mismas condiciones generales de laboratorio durante cinco días. Al finalizar este periodo se obtuvieron las muestras M1 y M2 para la caracterización fisicoquímica, microbiológica y fenotípica.

El estudio se ejecutó en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ), en la ciudad de Quevedo, Ecuador.

2.3. Obtención de las muestras

Al quinto día de fermentación se obtuvo una muestra de cada uno de los dos frascos, identificándose como M1 la procedente del primer frasco y como M2 la procedente del segundo.

Previamente a la toma de la fracción líquida, cada recipiente fue agitado manualmente y posteriormente dejado en reposo para permitir la sedimentación gravitacional de los gránulos de kéfir. Una vez sedimentados los gránulos, se tomó la fracción líquida ubicada sobre estos para las determinaciones fisicoquímicas y microbiológicas.

La fracción líquida se separó únicamente por sedimentación, sin centrifugar ni filtrar.

2.4. Caracterización fisicoquímica

En la fracción líquida de cada fermento se determinaron el pH y los sólidos solubles expresados en °Brix. Para cada variable se efectuaron tres lecturas técnicas por muestra y se calculó el promedio. El pH se midió con un medidor de mesa Ohaus AquaSearcher AB33M1, con rango de -2,00 a 20,00 unidades de pH y resolución de 0,01. El equipo se calibró diariamente antes de las mediciones con soluciones amortiguadoras estándar de pH 4,01, 7,00 y 10,01 y estuvo sujeto al programa institucional de mantenimiento preventivo. Los sólidos solubles se determinaron con un refractómetro digital de bolsillo Atago PAL-3, con rango de 0,0 a 93,0 °Brix y resolución de 0,1 °Brix; el equipo se ajustó a cero con agua destilada antes del análisis. Las mediciones se realizaron a temperatura ambiente y los registros automáticos de los equipos se situaron entre 25,0 y 28,7 °C. Las tres lecturas por muestra se consideraron repeticiones técnicas.

Las lecturas se utilizaron para obtener el promedio de cada fermento y no para incrementar el número de unidades experimentales. Entre mediciones, el electrodo y el prisma se enjuagaron minuciosamente con agua destilada y se secaron con papel absorbente para reducir el riesgo de contaminación cruzada.

2.5. Caracterización microbiológica y fenotípica

M1 y M2 se sometieron a cultivo en un medio nutritivo de formulación propia, similar al *Plate Count Agar* (en adelante, medio PCA-m), tinción de Gram y observación microscópica, prueba de catalasa y un ensayo fenotípico exploratorio en medio con almidón. Para el procesamiento microbiológico se tomó 1 mL de cada muestra y se prepararon diluciones seriadas en agua destilada esterilizada, transfiriendo 100 µL de la dilución previa a 900 µL de diluyente, desde 10^{-1} hasta 10^{-10}. Para el seguimiento cualitativo en las placas representativas se inocularon 10 µL de la muestra madre por cuadrante, para un total de 40 µL por placa y una placa representativa por muestra. De forma paralela, las diluciones 10^{-3} a 10^{-10} se sembraron con el fin de estimar la carga microbiana; sin embargo, el número de colonias no disminuyó de forma

progresiva y consistente entre diluciones sucesivas, por lo que no se calcularon unidades formadoras de colonias (UFC/mL).

El medio PCA-m contuvo, por litro, 1,5 g de extracto de levadura, 1 g de leche en polvo, 2 g de peptona, 1 g de glucosa, 15 g de agar-agar y 1000 mL de agua destilada. La inoculación cualitativa se realizó mediante estriado por cuadrantes. La siembra se realizó en placas Petri de plástico, que se sellaron con Parafilm y se incubaron a 28 °C durante 72 h, en oscuridad y en posición invertida. El crecimiento se documentó visual y fotográficamente al momento de la siembra y a las 24, 48 y 72 h. Las colonias se observaron con estereoscopio.

La tinción de Gram se efectuó sobre material procedente del crecimiento obtenido en el medio PCA-m. Se extendió una pequeña cantidad de crecimiento sobre un portaobjetos y se aplicaron cristal violeta durante 1 min, Lugol durante 1 min, alcohol-acetona durante 15 s y safranina durante 1 min, con enjuagues con agua entre etapas. Las preparaciones se examinaron con un microscopio OHAUS, utilizando un objetivo de 100× y aceite de inmersión. Las observaciones se interpretaron en términos de morfología celular y respuesta diferencial a la tinción, sin asignación taxonómica.

La actividad catalasa se evaluó sobre material cultivado en el medio PCA-m mediante la adición de una gota de peróxido de hidrógeno de 10 volúmenes (aproximadamente 3 % de H_2O_2). Se consideró positiva la formación inmediata de burbujas. El ensayo no incluyó controles positivo ni negativo. Se realizaron tres repeticiones de la prueba por cada placa seleccionada, para un total de seis determinaciones correspondientes a las dos muestras. Debido a la naturaleza mixta del crecimiento, la respuesta se atribuyó al material cultivado y no a una especie determinada.

2.6. Ensayos fenotípicos exploratorios

El ensayo con almidón se realizó en un medio con azul de bromotimol como indicador de pH. El medio se preparó, por litro, con 2 g de leche, 2 g de almidón, 15 g de agar-agar y 1600 µL de azul de bromotimol; se elaboraron aproximadamente 150 mL, que se distribuyeron en tubos previamente esterilizados (aproximadamente 15 mL por tubo) y se esterilizaron nuevamente antes de la inoculación. El azul de bromotimol se utilizó como indicador de pH, considerando su coloración verde en condiciones cercanas a la neutralidad, amarilla en condiciones ácidas y azulada en condiciones alcalinas. Cada tubo se inoculó mediante transferencia de material proveniente de colonias desarrolladas previamente en el medio PCA-m, utilizando un asa bacteriológica de mango intercambiable con una punta larga para introducir el inóculo en el interior del tubo. La incubación se realizó a 28 °C durante 72 horas, en las mismas condiciones de laboratorio empleadas para el cultivo en el medio PCA-m, con los tubos mantenidos en oscuridad.

Se incluyeron dos controles, correspondientes a un control de inóculo y un control de pH neutro (pH 7), este último con coloración verde; la composición del control de inóculo no quedó documentada en el registro experimental. Se trabajó con tres repeticiones para M1 y tres repeticiones para M2, para un total de ocho tubos, incluidos los dos controles. El cambio de color del indicador se interpretó como evidencia de modificación del pH del medio. La acidificación observada se consideró un resultado fenotípico exploratorio y no una demostración específica de la hidrólisis del almidón, debido a que el cambio de pH puede estar asociado a diferentes procesos metabólicos del crecimiento microbiano, entre ellos la utilización de los componentes de la leche incorporada al medio.

2.7. Análisis de la información

Los datos se analizaron de forma descriptiva; los valores fisicoquímicos corresponden al promedio de tres lecturas técnicas por fermento.

2.8. Consideraciones éticas

El estudio se realizó exclusivamente con fermentos de kéfir de agua y no involucró participantes humanos ni animales.

3. Resultados

3.1. Características fisicoquímicas de los fermentos

Las muestras M1 y M2 presentaron valores de pH próximos entre sí: 4,19 y 4,14, respectivamente. Los sólidos solubles fueron de 0,4 °Brix en M1 y 0,6 °Brix en M2 (Tabla 1).

Tabla 1

Características fisicoquímicas de dos fermentos de kéfir de agua después de cinco días de fermentación

Muestra	Procedencia	Tiempo de fermentación	pH	Sólidos solubles (°Brix)
M1	Frasco 1	5 días	4,19	0,4
M2	Frasco 2	5 días	4,14	0,6

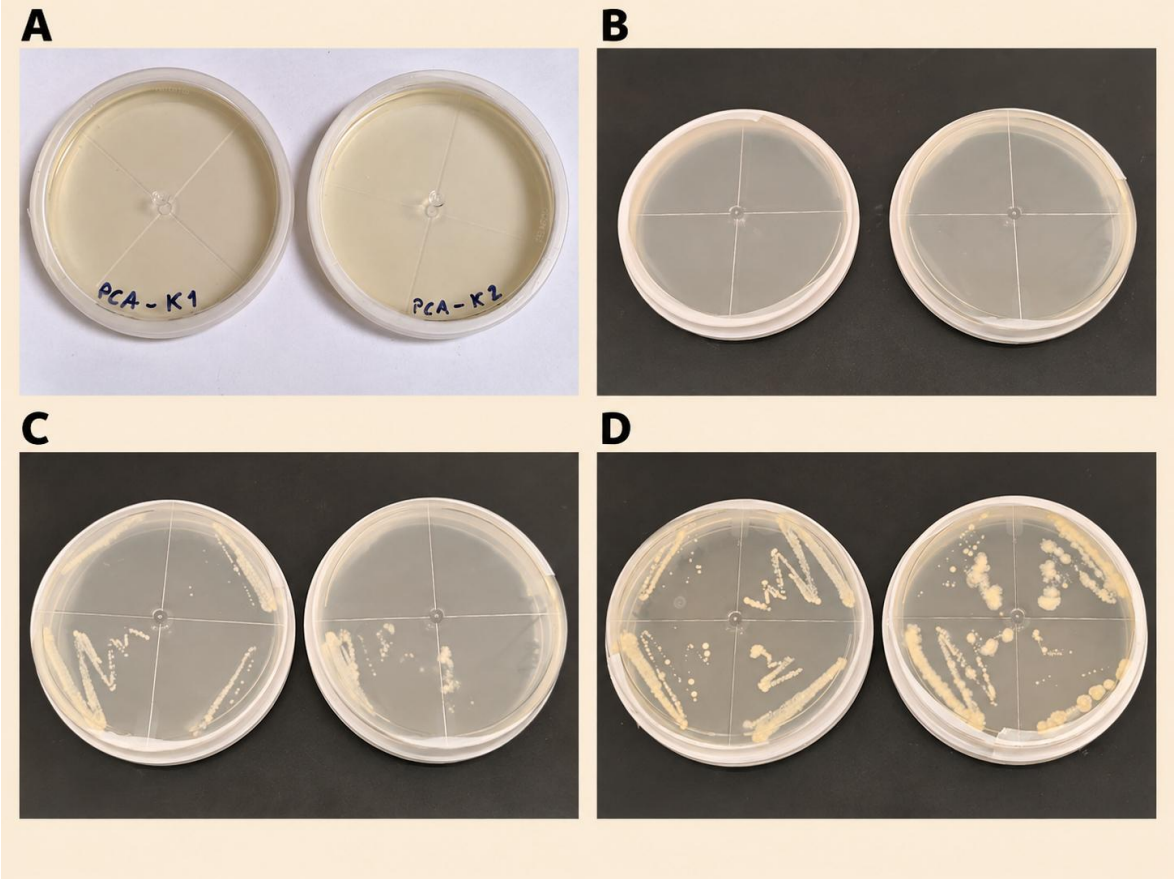
Nota. Los valores de pH y sólidos solubles corresponden al promedio de tres mediciones técnicas por muestra. M1 y M2 proceden de dos frascos independientes mantenidos bajo las mismas condiciones.

3.2. Crecimiento microbiológico en medio PCA-m

Las muestras M1 y M2 presentaron crecimiento microbiológico en el medio PCA-m (Figura 1). El seguimiento de las placas permitió observar el desarrollo de colonias durante el periodo de incubación y su posterior visualización mediante estereoscopio.

Figura 1

Crecimiento microbiológico de M1 y M2 en medio PCA-m



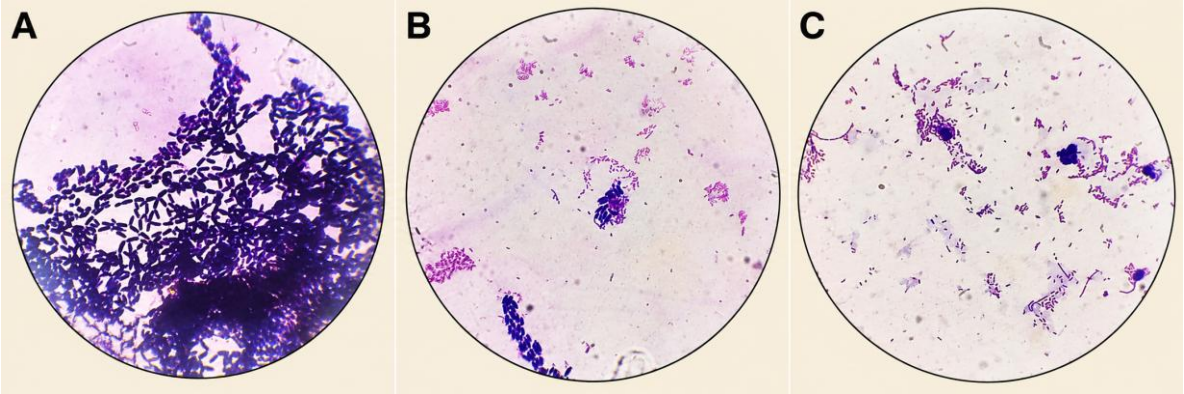
Nota. Seguimiento del crecimiento: (A) siembra, 0 h; (B) 24 h; (C) 48 h; (D) 72 h. Izquierda: M1 (PCA-K1); derecha: M2 (PCA-K2). Fotografías originales del estudio.

3.3. Caracterización microscópica del crecimiento cultivable

La tinción de Gram y la observación microscópica del material recuperado en el medio PCA-m evidenciaron heterogeneidad morfológica en el crecimiento cultivable (Figura 2). Algunas preparaciones mostraron predominio de bacilos Gram positivos (Figura 2A), mientras que otras presentaron predominio de bacilos y cocobacilos Gram negativos, acompañados de pequeñas agrupaciones Gram positivas (Figura 2B). Asimismo, se registraron estructuras de mayor tamaño, teñidas con cristal violeta y de morfología compatible con levaduras, junto a bacilos de respuesta Gram variable (Figura 2C).

Figura 2

Características microscópicas del crecimiento cultivable



Nota. (A) Bacilos con respuesta predominantemente Gram positiva; (B) bacilos y cocobacilos con respuesta predominantemente Gram negativa, con pequeñas agrupaciones Gram positivas; (C) bacilos de respuesta Gram variable y estructuras de mayor tamaño compatibles con levaduras. Las micrografías corresponden a material representativo recuperado del medio PCA-m de M1 y M2 y observado con objetivo de 100× y aceite de inmersión; el registro no permite atribuir cada panel a una muestra concreta. Fotografías originales del estudio. Las observaciones no se utilizaron para asignación taxonómica.

3.4. Actividad catalasa en el material cultivado

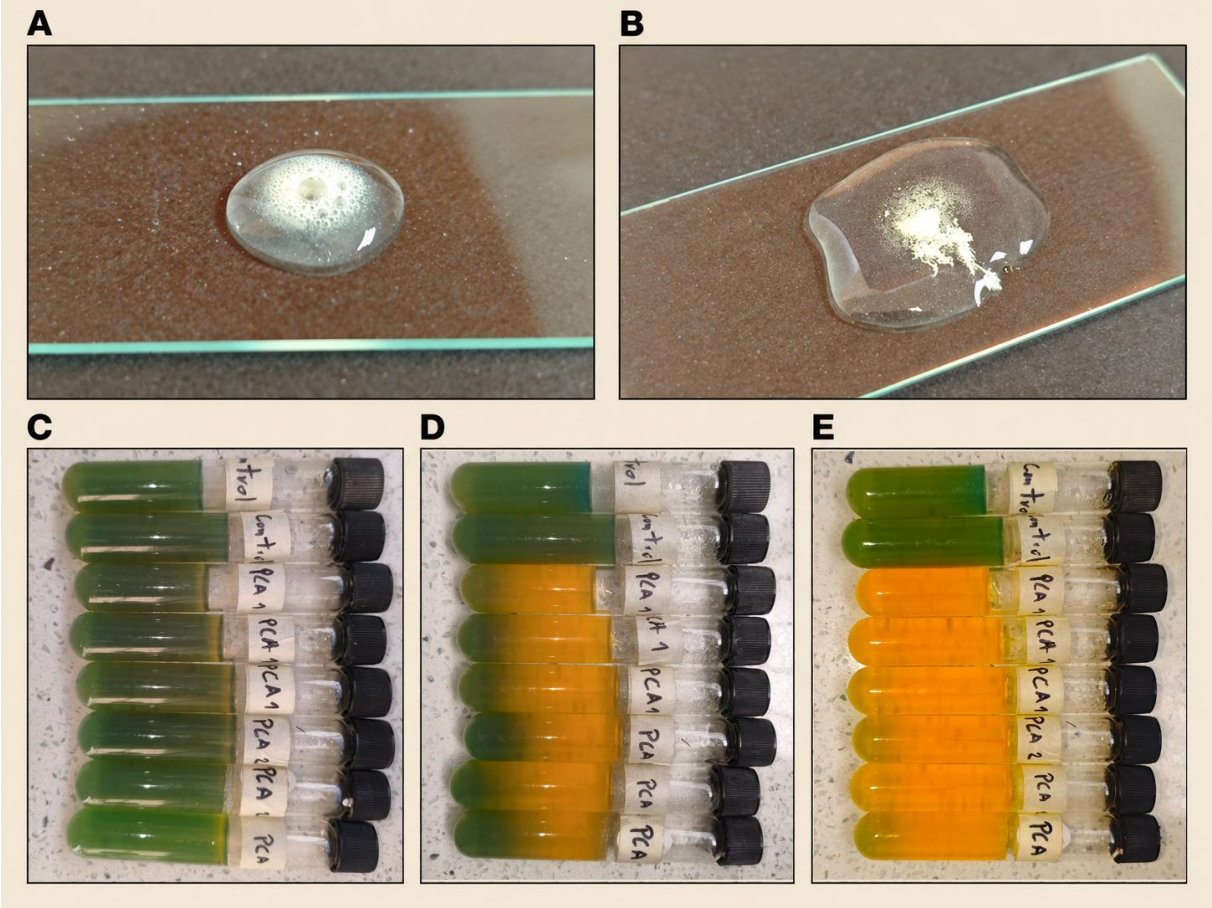
Las seis determinaciones de catalasa, tres por muestra, mostraron formación inmediata de burbujas después de la adición de peróxido de hidrógeno, una respuesta compatible con actividad catalasa en el material cultivado (Figura 3A–B). La ausencia de controles positivo y negativo limita la validación del ensayo.

3.5. Respuesta metabólica en medio con almidón

Durante el seguimiento del ensayo en medio con almidón y azul de bromotimol, los seis tubos inoculados con material procedente de los cultivos en el medio PCA-m mostraron un viraje progresivo del indicador de verde a amarillo, incipiente a las 24 h en la porción superior del medio y extendido a la mayor parte del tubo a las 72 h, mientras que los tubos control conservaron la coloración verde (Figura 3C–E).

Figura 3

Caracterización fenotípica del material cultivado



Nota. (A–B) Reacción de catalasa correspondiente a M1 (A) y M2 (B). (C–E) Seguimiento del ensayo exploratorio en medio con almidón a las 24 h (C), 48 h (D) y 72 h (E). En los paneles C, D y E, la disposición de los tubos es: tubos 1–2 (controles), tubos 3–5 (réplicas de M1) y tubos 6–8 (réplicas de M2). Fotografías originales del estudio.

4. Discusión

El objetivo de este estudio fue caracterizar de forma preliminar dos fermentos de kéfir de agua elaborados con panela, y el hallazgo más destacable fue que ambos alcanzaron al quinto día un medio ácido (pH 4,14–4,19) con bajo contenido residual de sólidos solubles (0,4–0,6 °Brix) y una fracción cultivable morfológicamente heterogénea, rasgos coherentes con un consorcio fermentativo (Lynch et al., 2021). Este resultado es relevante porque el fermento caracterizado se emplea en ensayos con plantas, y la literatura advierte que la composición del kéfir de agua cambia con el inóculo, el sustrato y las condiciones de producción, de modo que su uso experimental exige una descripción previa del material aplicado (Laureys et al., 2021; Pendón et al., 2022). Sin embargo, la ausencia de mediciones iniciales impide cuantificar la acidificación y el consumo de azúcares durante el periodo de fermentación, y la naturaleza cultivable y fenotípica de los análisis limita la resolución taxonómica alcanzada frente a los enfoques moleculares (Amann et al., 1995; Verce et al., 2019). Por ello, resulta

necesario continuar esta línea de investigación con más unidades de fermentación, muestreos temporales y métodos moleculares que permitan vincular la composición del fermento con los efectos observados en cultivos como el cacao y el tomate (Arrieta-Echeverri et al., 2023; Lamont et al., 2017).

4.1. Características fisicoquímicas de los fermentos

La condición ácida observada concuerda con la naturaleza fermentativa descrita para el kéfir de agua. Lynch et al. (2021) señalan que los gránulos de kéfir de agua constituyen una comunidad simbiótica de bacterias y levaduras y que entre sus integrantes principales se encuentran bacterias ácido-lácticas, levaduras y bacterias ácido-acéticas. Estos microorganismos participan en transformaciones del sustrato que generan, entre otros productos, ácidos orgánicos, etanol y dióxido de carbono. No obstante, la composición y el comportamiento del sistema dependen del cultivo, el sustrato y las condiciones de producción, por lo que los valores obtenidos en M1 y M2 deben interpretarse como propios de los fermentos estudiados y no como valores universales del kéfir de agua. En términos numéricos, Laureys y De Vuyst (2014) registraron un descenso del pH de 4,26 a 3,45 durante las primeras 72 h, y de Carvalho Alves et al. (2024) informaron valores entre 3,52 y 4,29 en bebidas de extracto de licurí fermentadas con gránulos de kéfir de agua. El pH de M1 y M2 se sitúa en el extremo superior de ese intervalo, lo que podría relacionarse con la baja concentración de panela empleada (30 g/L); esta hipótesis requiere mediciones de azúcares y ácidos orgánicos para verificarse.

Los valores finales de °Brix representan sólidos solubles totales y no concentraciones específicas de sacarosa, glucosa o fructosa. En consecuencia, no permiten calcular el consumo de azúcares ni atribuir la diferencia numérica entre M1 y M2 a una actividad metabólica distinta. Estudios experimentales muestran que el perfil fisicoquímico del kéfir de agua varía con el sustrato, el tipo de azúcar, el agua, el inóculo, el oxígeno, la temperatura y el manejo de los gránulos (Gökırmaklı et al., 2023; Güzel-Seydim et al., 2023; Laureys & De Vuyst, 2014; Laureys et al., 2019, 2021, 2022; Lima et al., 2024; Sin et al., 2024; Tavares et al., 2023; Tireki, 2025). Por ello, los valores de M1 y M2 se interpretan únicamente como mediciones finales de los fermentos estudiados.

En el contexto ecuatoriano, Monar et al. (2014) estudiaron kéfir de agua artesanal elaborado con diferentes endulzantes y tiempos de fermentación y evaluaron variables químicas, entre ellas °Brix, junto con características microbiológicas. Este antecedente resulta pertinente porque demuestra la utilidad de combinar indicadores fisicoquímicos y microbiológicos en la caracterización de kéfir de agua de origen ecuatoriano. Sin embargo, su diseño experimental, los sustratos y los tiempos evaluados difieren de los utilizados en el presente estudio, por lo que sus resultados no se emplean como valores de referencia directa para M1 y M2. Además, la panela conserva glucosa, fructosa, minerales y compuestos fenólicos junto con la sacarosa, lo que la diferencia del azúcar refinado empleado

en buena parte de los estudios de referencia y constituye otra razón para no extrapolar directamente los valores publicados a los fermentos aquí caracterizados (Alarcón et al., 2021; Jaffé, 2015).

4.2. Crecimiento cultivable y morfología microscópica

El crecimiento observado en el medio PCA-m en las dos muestras evidencia la presencia de microorganismos viables capaces de desarrollarse bajo las condiciones de cultivo utilizadas. Este hallazgo es coherente con la naturaleza microbiológicamente compleja del kéfir de agua. Mediante secuenciación metagenómica, Verce et al. (2019) demostraron que un ecosistema de kéfir de agua podía albergar simultáneamente diferentes bacterias y levaduras. No obstante, el crecimiento en el medio PCA-m del presente estudio representa únicamente la fracción cultivable recuperada bajo las condiciones empleadas y no permite describir la totalidad de la comunidad microbiana, dado que los medios de cultivo omiten microorganismos no cultivables presentes en los alimentos fermentados (Amann et al., 1995; Tamang et al., 2016).

La observación microscópica mostró estructuras bacilares y cocobacilares, además de células de mayor tamaño compatibles con levaduras. Esta heterogeneidad morfológica concuerda, de forma general, con la naturaleza consorcial del kéfir de agua (Lynch et al., 2021; Verce et al., 2019). La coexistencia de morfotipos Gram positivos y Gram negativos es coherente con la presencia descrita en el kéfir de agua de bacterias ácido-lácticas, Gram positivas, y de bacterias ácido-acéticas, Gram negativas (Gomes et al., 2018; Lynch et al., 2021; Mokoena et al., 2021). Sin embargo, la concordancia morfológica no constituye identificación taxonómica. La tinción de Gram no permite asignar los microorganismos observados a géneros o especies particulares (Beveridge, 2001).

Esta delimitación es necesaria al comparar los resultados con estudios que aplicaron herramientas de mayor resolución. Monar et al. (2014) combinaron la caracterización fenotípica con ADNr 16S, mientras que Verce et al. (2019), Arrieta-Echeverri et al. (2023), de Carvalho Alves et al. (2024) y Garmendia et al. (2026) utilizaron enfoques moleculares o multi-ómicos. Las identificaciones comunicadas en esos trabajos no pueden trasladarse a los morfotipos observados en M1 y M2. En consecuencia, la confirmación de los grupos sugeridos por la morfología requerirá aislamiento en medios selectivos e identificación molecular, tal como se ha realizado en estudios que describieron la diversidad del kéfir de agua mediante secuenciación de genes ribosomales (Gulitz et al., 2011; Marsh et al., 2013).

4.3. Actividad catalasa y respuesta metabólica en medio con almidón

La formación inmediata de burbujas después de la adición de peróxido de hidrógeno fue compatible con actividad catalasa en el material recuperado en el

medio PCA-m. Debido a que la prueba se realizó sobre crecimiento microbiológico mixto y no sobre aislamientos purificados e identificados, esta respuesta se interpreta de forma exploratoria para el material cultivado en conjunto. La ausencia de controles positivo y negativo limita la validación del ensayo. Por la misma razón, la reacción no puede utilizarse para atribuir actividad catalasa a ninguno de los morfotipos observados ni para identificar grupos microbianos concretos. Adicionalmente, las bacterias ácido-lácticas se describen como microorganismos catalasa negativos (Mokoena et al., 2021); por ello, la reacción positiva sugiere la contribución de otros componentes del crecimiento mixto, como las células levaduriformes o los morfotipos Gram negativos observados, hipótesis que requiere confirmarse con aislamientos purificados.

El ensayo exploratorio realizado en medio con almidón mostró un viraje del indicador que refleja cambios en las condiciones ácido-base del medio. Este comportamiento constituye evidencia de actividad metabólica en el material inoculado; sin embargo, el indicador utilizado no demuestra específicamente la hidrólisis del almidón. En consecuencia, el resultado se interpreta como modificación del medio asociada con actividad metabólica y no como confirmación de actividad amilolítica. Además, el medio contenía leche, cuyo aprovechamiento microbiano también puede generar acidificación; la confirmación de actividad amilolítica requiere revelar el almidón residual con solución de yodo (Lugol) y verificar la formación de halos de hidrólisis alrededor del crecimiento.

4.4. Limitaciones y líneas futuras

Las principales limitaciones fueron el número reducido de unidades de fermentación, la ausencia de una línea basal fisicoquímica, la falta de una estimación cuantitativa confiable de la carga microbiana y la ausencia de identificación molecular. Además, el registro experimental no conservó el volumen utilizado en cada lectura fisicoquímica, los modelos del microscopio y del estereoscopio, la condición atmosférica de incubación, la concentración y el disolvente de la solución de azul de bromotimol, el tipo de leche incorporada al medio con almidón, las condiciones de esterilización de ese medio ni la composición del control de inóculo. Un ensayo exploratorio de ureasa se excluyó del análisis porque el medio se preparó con sulfato de amonio en lugar de urea, lo que impidió una interpretación válida. Estas condiciones limitan la reproducibilidad instrumental y no permiten estimar abundancias, identificar taxones o generalizar los hallazgos a otros cultivos de kéfir de agua.

Los resultados sugieren un sistema fermentativo microbiano mixto, aunque no identifican su composición ni reconstruyen su dinámica durante los cinco días. El estudio aporta un registro preliminar del material analizado y define los procedimientos que requieren estandarización en una fase posterior. En estudios posteriores convendría ampliar el número de fermentaciones independientes,

incorporar mediciones basales y muestreos temporales, estandarizar un procedimiento cuantitativo de recuento microbiológico y complementar la caracterización con aislamiento de cultivos y métodos moleculares. Estas estrategias permitirían evaluar variación entre unidades, dinámica fermentativa y composición microbiana con mayor resolución.

5. Conclusiones

Los fermentos de kéfir de agua mantenidos en el laboratorio presentan, al quinto día, un medio ácido (pH 4,14–4,19) con bajo contenido residual de sólidos solubles (0,4–0,6 °Brix). Asimismo, la fracción cultivable mostró morfotipos bacilares y cocobacilares, estructuras compatibles con levaduras y una reacción compatible con actividad catalasa. El cambio de coloración en el medio con almidón indicó una modificación ácido-base, pero no demostró actividad amilolítica específica. Estos resultados sirven como línea base del fermento que el grupo aplica en ensayos con plantas. La siguiente etapa requiere más unidades de fermentación, mediciones iniciales y recuentos en medios selectivos para bacterias ácido-lácticas y levaduras.

Contribución de los autores: Conceptualización: M.S.C.P. Metodología: M.S.C.P. Análisis formal: M.S.C.P. Investigación: C.F.I.V., P.C.V.Z. y J.X.S.R. Curación de datos: R.J.H.F. Redacción del borrador original: M.S.C.P. Redacción (revisión y edición): M.S.C.P. y R.J.H.F. Supervisión: M.S.C.P. Administración del proyecto: M.S.C.P. Todos los autores han leído y aceptado la versión publicada del manuscrito.

Financiamiento: La investigación contó con el apoyo de la universidad mediante la disponibilidad de infraestructura, equipos y materiales de laboratorio. Los reactivos fueron adquiridos con recursos propios de los autores. No se recibió financiamiento externo.

Agradecimientos: Los autores agradecen a los técnicos de laboratorio por su apoyo y colaboración durante el desarrollo de las actividades experimentales de esta investigación.

Declaración de disponibilidad de datos: Los datos que sustentan los resultados de esta investigación constan en el informe del estudio y están disponibles previa solicitud a la autora 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.

Uso de inteligencia artificial: Se emplearon herramientas de inteligencia artificial generativa únicamente como apoyo en la edición de estilo, organización del manuscrito y verificación formal. No se utilizaron para generar datos

experimentales, resultados ni observaciones de laboratorio. La responsabilidad sobre el contenido científico y la versión final corresponde al equipo autoral.

Referencias Bibliográficas

Alarcón, A. L., Palacios, L. M., Osorio, C., Narváez, P. C., Heredia, F. J., Orjuela, A., & Hernanz, D. (2021). Chemical characteristics and colorimetric properties of non-centrifugal cane sugar ("panela") obtained via different processing technologies. *Food Chemistry*, *340*, 128183. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128183

Amann, R. I., Ludwig, W., & Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, *59*(1), 143–169. https://doi.org/10.1128/mr.59.1.143-169.1995

Arrieta-Echeverri, M. C., Fernández, G. J., Duarte-Riveros, A., Correa-Álvarez, J., Bardales, J. A., Villanueva-Mejía, D. F., & Sierra-Zapata, L. (2023). Multi-omics characterization of the microbial populations and chemical space composition of a water kefir fermentation. *Frontiers in Molecular Biosciences*, *10*, 1223863. https://doi.org/10.3389/fmolb.2023.1223863

Beveridge, T. J. (2001). Use of the Gram stain in microbiology. *Biotechnic & Histochemistry*, *76*(3), 111–118. https://doi.org/10.1080/bih.76.3.111.118

de Carvalho Alves, J., de Souza, C. O., de Matos Santos, L., Viana, S. N. A., de Jesus Assis, D., Tavares, P. P. L. G., Requião, E. dos R., Ferro, J. M. R. B. dos S., & Roselino, M. N. (2024). Licuri kernel (*Syagrus coronata* (Martius) Beccari): A promising matrix for the development of fermented plant-based kefir beverages. *Foods*, *13*(13), 2056. https://doi.org/10.3390/foods13132056

Davidović, S. Z., Miljković, M. G., Antonović, D. G., Rajilić-Stojanović, M. D., & Dimitrijević-Branković, S. I. (2015). Water kefir grain as a source of potent dextran producing lactic acid bacteria. *Hemijska Industrija*, *69*(6), 595–604. https://doi.org/10.2298/HEMIND140925083D

Fiorda, F. A., de Melo Pereira, G. V., Thomaz-Soccol, V., Rakshit, S. K., Pagnoncelli, M. G. B., Vandenberghe, L. P. de S., & Soccol, C. R. (2017). Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation: A review. *Food Microbiology*, *66*, 86–95. https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.04.004

Garmendia, G., Gyenes, F., Alvarez, A., Arbildi, E., Giménez, S., Gonda, M., & Vero, S. (2026). Dynamic microbiota in water kefir: Microbial shift and ecological selection during fermentation. *BMC Microbiology*, *26*, 271. https://doi.org/10.1186/s12866-025-04461-y

Gökırmaklı, Ç., Karagül Yüceer, Y., & Güzel-Seydim, Z. B. (2023). Chemical, microbial, and volatile changes of water kefir during fermentation with

economic substrates. *European Food Research and Technology*, *249*(7), 1717–1728. https://doi.org/10.1007/s00217-023-04242-9

Gomes, R. J., Borges, M. F., Rosa, M. F., Castro-Gómez, R. J. H., & Spinosa, W. A. (2018). Acetic acid bacteria in the food industry: Systematics, characteristics and applications. *Food Technology and Biotechnology*, *56*(2), 139–151. https://doi.org/10.17113/ftb.56.02.18.5593

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

Güzel-Seydim, Z. B., Şatır, G., & Gökırmaklı, Ç. (2023). Use of mandarin and persimmon fruits in water kefir fermentation. *Food Science & Nutrition*, *11*(10), 5890–5897. https://doi.org/10.1002/fsn3.3561

Jaffé, W. R. (2015). Nutritional and functional components of non centrifugal cane sugar: A compilation of the data from the analytical literature. *Journal of Food Composition and Analysis*, *43*, 194–202. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2015.06.007

Lamont, J. R., Wilkins, O., Bywater-Ekegärd, 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., Aerts, M., Vandamme, P., & De Vuyst, L. (2018). Oxygen and diverse nutrients influence the water kefir fermentation process. *Food Microbiology*, *73*, 351–361. https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.02.007

Laureys, D., Aerts, M., Vandamme, P., & De Vuyst, L. (2019). The buffer capacity and calcium concentration of water influence the microbial species diversity, grain growth, and metabolite production during water kefir fermentation. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 2876. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02876

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., & De Vuyst, L. (2017). The water kefir grain inoculum determines the characteristics of the resulting water kefir fermentation process. *Journal of Applied Microbiology*, *122*(3), 719–732. https://doi.org/10.1111/jam.13370

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

Laureys, D., Leroy, F., Vandamme, P., & De Vuyst, L. (2022). Backslopping time, rinsing of the grains during backslopping, and incubation temperature influence the water kefir fermentation process. *Frontiers in Microbiology*, *13*, 871550. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.871550

Lima, A. L. B. C., Pinheiro, L. R., de Souza, B. J. F., & Pereira, A. F. (2024). Different sources of sucrose in water kefir fermentation. *Brazilian Journal of Food Technology*, *27*, e2024012. https://doi.org/10.1590/1981-6723.01224

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

Marsh, A. J., O'Sullivan, O., Hill, C., Ross, R. P., & Cotter, P. D. (2013). Sequence-based analysis of the microbial composition of water kefir from multiple sources. *FEMS Microbiology Letters*, *348*(1), 79–85. https://doi.org/10.1111/1574-6968.12248

Mokoena, M. P., Omatola, C. A., & Olaniran, A. O. (2021). Applications of lactic acid bacteria and their bacteriocins against food spoilage microorganisms and foodborne pathogens. *Molecules*, *26*(22), 7055. https://doi.org/10.3390/molecules26227055

Monar, M., Dávalos, I., Zapata, S., Caviedes, M., & Ramírez-Cárdenas, L. (2014). Caracterización química y microbiológica del kéfir de agua artesanal de origen ecuatoriano. *ACI Avances en Ciencias e Ingenierías*, *6*(1), B60–B66. https://doi.org/10.18272/aci.v6i1.160

Pendón, M. D., Bengoa, A. A., Iraporda, C., Medrano, M., Garrote, G. L., & Abraham, A. G. (2022). Water kefir: Factors affecting grain growth and health-promoting properties of the fermented beverage. *Journal of Applied Microbiology*, *133*(1), 162–180. https://doi.org/10.1111/jam.15385

Raman, J., Kim, J.-S., Choi, K. R., Eun, H., Yang, D., Ko, Y.-J., & Kim, S.-J. (2022). Application of lactic acid bacteria (LAB) in sustainable agriculture: Advantages and limitations. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(14), 7784. https://doi.org/10.3390/ijms23147784

Sin, P. Y., Tan, S. H., Asras, M. F. F., Lee, C. M., & Lee, T. C. (2024). Probiotic growth pattern and physicochemical evaluation of water kefir fermentation. *Malaysian Applied Biology*, *53*(2), 21–30. https://doi.org/10.55230/mabjournal.v53i2.2742

Stadie, J., Gulitz, A., Ehrmann, M. A., & Vogel, R. F. (2013). Metabolic activity and symbiotic interactions of lactic acid bacteria and yeasts isolated from

water kefir. *Food Microbiology*, *35*(2), 92–98. https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.03.009

Tamang, J. P., Watanabe, K., & Holzapfel, W. H. (2016). Review: Diversity of microorganisms in global fermented foods and beverages. *Frontiers in Microbiology*, *7*, 377. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00377

Taşkın, B., & Akköprü, A. (2020). Antibacterial activity of different kefir types against various plant pathogenic bacteria. *Journal of Agricultural Sciences (Tarım Bilimleri Dergisi)*, *26*(3), 316–323. https://doi.org/10.15832/ankutbd.499790

Tavares, P., Mamona, C. T. P., Nascimento, R. Q., dos Anjos, E. A., de Souza, C. D., Almeida, R. C. C., Mamede, M. E. O., & Magalhães-Guedes, K. (2023). Non-conventional sucrose-based substrates: Development of non-dairy kefir beverages with probiotic potential. *Fermentation*, *9*(4), 384. https://doi.org/10.3390/fermentation9040384

Tireki, S. (2025). Influence of water properties on the physicochemical and sensorial parameters of water kefir. *Journal of Culinary Science & Technology*, *23*(3), 579–599. https://doi.org/10.1080/15428052.2024.2303002

Verce, M., De Vuyst, L., & Weckx, S. (2019). Shotgun metagenomics of a water kefir fermentation ecosystem reveals a novel *Oenococcus* species. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 479. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00479

Wilches-López, L., Correa-Espinal, A., Pérez-Monterroza, E. J., & Rojas, L. F. (2023). Metataxonomic and metabolic evaluation of three water kefir microbiomes cultured in sugar cane juice. *Journal of Food Process Engineering*, *46*(11), e14281. https://doi.org/10.1111/jfpe.14281