



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE  
HIDALGO  
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E  
INGENIERÍA

---

---

CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

Análisis del adenoviroma asociado a ensilados de  
*Agave salmiana*, con fines de inocuidad alimentaria  
para el ganado

TESIS

Que presenta

María Fernanda Camacho Tovar

Para obtener el título de

BIÓLOGA

Director: Pablo Octavio Aguilar

Codirector: Fred Eduardo Hernández Perea

Mineral de la Reforma, Hidalgo.

2025

# HOJA DE IMPRESIÓN



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo  
Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería  
School of Engineering and Basic Sciences

Mineral de la Reforma, Hgo., a 8 de julio de 2025

Número de control: ICBI-D/1248/2025

Asunto: Autorización de impresión.

**MTRA. OJUKY DEL ROCÍO ISLAS MALDONADO**  
**DIRECTORA DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR DE LA UAEH**

Con Título Quinto, Capítulo II, Capítulo V, Artículo 51 Fracción IX del Estatuto General de nuestra Institución, por este medio, le comunico que el Jurado asignado a la egresada de la Licenciatura en **María Fernanda Camacho Tovar**, quien presenta el trabajo de titulación "**Análisis del adenoviroma asociado a ensilados de *Agave salmiana*, con fines de inocuidad alimentaria para el ganado**", ha decidido, después de revisar fundamento en lo dispuesto en el Título Tercero, Capítulo I, Artículo 18 Fracción IV; dicho trabajo en la reunión de sinodales, **autorizar la impresión del mismo**, una vez realizadas las correcciones acordadas.

A continuación, firman de conformidad los integrantes del Jurado:

**Presidente:** Dra. Sylvia Martínez Hernández

**Secretario:** M. en C. Fred Eduardo Hernández Perea

**Vocal:** Dr. Pablo Octavio Aguilar

**Suplente:** Dra. Dulce María Galván Hernández

Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente  
"Amor, Orden y Progreso"

Mtro. Gabriel Vergara Rodríguez  
Director del ICBI



GVR/YCC

Ciudad del Conocimiento, Carretera Pachuca-Tulancingo Km. 4.5 Colonia Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo, México, C.P. 42184  
Teléfono: 771 71 720 00 Ext. 40001  
direccion\_icbi@uaeh.edu.mx, vergara@uaeh.edu.mx

"Amor, Orden y Progreso"



uaeh.edu.mx

## **DEDICATORIA**

Agradezco a Dios por brindarme la fortaleza, la sabiduría y por guiarme siempre por el camino correcto, permitiéndome avanzar con determinación hacia la persona y profesional que aspiro ser.

A mis padres, gracias por confiar en mí en cada etapa de este proceso, por su paciencia, su amor, su inspiración y su exigencia constante. Tengo el privilegio de contar con su presencia y guía, y de haber crecido con sus enseñanzas, que me han forjado en la disciplina, la resiliencia y el compromiso. Este logro no habría sido posible sin su apoyo incondicional. Todo lo alcanzado es también fruto del amor, los valores y el ejemplo que me han dado.

A mi familia, gracias por cada palabra de aliento, por su apoyo constante y por celebrar conmigo cada pequeño logro a lo largo de este camino. Su presencia y entusiasmo han sido una fuente invaluable de motivación.

A Danny, el amor de mi vida, gracias por enseñarme cada día algo nuevo, por regalarme risas incluso en los momentos más difíciles y por ayudarme a encontrar belleza en lo cotidiano. Tu compañía ha sido un refugio en medio del estrés, y tu amor, una fuente constante de calma y alegría. Gracias por confiar en mí, por hacerme sentir amada y por darme la certeza de que deseo compartir mi vida contigo.

Y finalmente, a mi perrita Maya, gracias por tu compañía incondicional en aquellas largas noches de estudio y desvelo. Tu amor silencioso, tu mirada fiel y tu sola presencia me dieron consuelo en los momentos más difíciles. Siempre estarás en mi corazón, en los recuerdos más dulces de este camino. Hasta siempre mi bebe hermosa.

## **AGRADECIMIENTOS**

This work was supported by Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología: FORDECYT-PRONACES/1312404/2020. Ensilaje de la pulpa (Guishe) de pencas de agave: Dinámica e interacciones de las comunidades microbianas y efecto del ensilado en el microbioma del rumen.

Al Laboratorio de Genética, Centro de Investigaciones Biológicas, Área Académica de Biología, de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

A mis profesores, a quienes mencionaré a continuación, por compartir generosamente sus conocimientos, por su orientación constante y por acompañarme a lo largo de este proceso académico. Gracias por brindarme las herramientas necesarias para llevar a cabo esta investigación y por su compromiso con mi formación profesional.

Dra Mayra de la Torre Coordinadora Subsede Hidalgo CIAD A.C. Distrito de Educación, Salud, Ciencia, Tecnología e Innovación.

Doctor en Ecología y Manejo de Recursos Naturales Pablo Octavio Aguilar.

Maestro en ciencias con especialidad en Biología Marina, Fred Eduardo Hernández Perea, CV CONACYT 628606.

Maestro en Ciencias en Agrotecnología y Desarrollo Sostenible, Luis Ángel Sánchez Cruz, CV CONACYT: 495557.

A mi compañera de laboratorio por asesorarme en mis buenas prácticas de laboratorio.

Ingeniera en Biotecnología Mayra Noemi Ávila Carrillo

## ÍNDICE

HOJA DE IMPRESIÓN.....	I
DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
ÍNDICE.....	IV
LISTADO DE FIGURAS.....	VI
LISTADO DE TABLAS.....	VII
RESUMEN.....	1
1 INTRODUCCIÓN.....	2
2 ANTECEDENTES.....	3
2.1 Ensilados.....	3
2.2 Ensilados no convencionales.....	4
2.3 Biotecnología del agave.....	5
2.4 Biología de Agave.....	6
2.5 Análisis de viromas.....	7
2.6 Virus asociados con agaves.....	9
2.7 Fagos y ensilados.....	10
2.8 Inocuidad alimentaria.....	11
3 JUSTIFICACIÓN.....	13
4 HIPÓTESIS.....	13
5 OBJETIVO GENERAL.....	14
6 OBJETIVOS PARTICULARES.....	14
7 MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
7.1 Ensilados.....	14
7.2 Extracción del DNA.....	17
7.2.1 Aislamiento del microbioma.....	17
7.2.2 Purificación y concentración del microbioma.....	17
7.2.3 Lisis y recuperación del material genético.....	17
7.3 Secuenciación de las muestras.....	18
7.4 Procesamiento bioinformático.....	19
7.5 Asignación taxonómica.....	19
7.6 Análisis estadístico.....	19
7.7 Análisis de diversidad.....	20
8 RESULTADOS.....	21
8.1 Diversidad Alfa.....	21
8.2 Diversidad beta.....	26
9 DISCUSIÓN.....	28
9.1 ENSILADO 1 (Tiempo 16 horas).....	29

9.2	ENSILADO 2 (Tiempo 72 horas) .....	33
9.3	ENSILADO 3(Tiempo 164 horas).....	33
9.4	ENSILADO 4 (Tiempo 288 horas).....	33
9.5	ENSILADO 5 (Tiempo 720 horas).....	34
9.6	BACTERIOFAGOS .....	35
10	CONCLUSIONES .....	37
11	REFERENCIAS .....	37

## LISTADO DE FIGURAS

- Figura 1.** Proceso de separación del ixtle para la obtención del guishe de *Agave salmiana*. ..... 15
- Figura 2.** Microsilos de PVC. Del lado derecho se observa el tornillo para compresión del material que elimina la mayor cantidad del agua en la muestra. .... 16
- Figura 3.** Ensilados con diferente tiempo de fermentación, panel izquierdo: material vegetal sin ensilar (guishe), panel derecho: agave ensilado por 30 días. .... 16
- Figura 4.** Composición porcentual de la diversidad representativa (Índice de Macintosh  $D < 1$ ) de los ensilados de *Agave salmiana*. Se muestran solo las especies cuya representatividad es mayor al 1%..... 22
- Figura 5.** Gráfico de abundancia seriada con los 37 OTUs dominantes en los ensilados de *Agave salmiana*. Las tonalidades más oscuras tienen una mayor cantidad de secuencias dentro de las muestras, mientras que las tonalidades más claras tienen menos. .... 24
- Figura 6.** Abundancia (A) y riqueza (B) del viroma asociado con ensilados de *Agave salmiana*, en diferentes tiempos. .... 25
- Figura 7.** Análisis de diversidad  $\beta$ , con distancias de Jaccard. El cambio en la coloración representa el valor de recambio. .... 27
- Figura 8.** Análisis multimétrico no dimensional (NMDS) de la composición viral entre ensilados de *Agave salmiana*, con diferentes tiempos de fermentación. .... 28

## LISTADO DE TABLAS

**Tabla 1.** Diversidad del viroma asociado con ensilados. .... 10

**Tabla 2.** Unidades Taxonómicas Operativas (OTUs) representativas de acuerdo con el índice de Macintosh. Se marcan con asterisco las especies presentes en todos los ensilados. T1: 16, T2: 72, T3: 164, T4: 288, T5: 720 horas. TsxE: Total de segmentos por ensilado. IM: Índice de Macintosh. %: Porcentaje del total de secuencias..... 22

**Tabla 3.** Índice de similitud de Jaccard (bajo la diagonal) y valores de probabilidad significativos en rojo (sobre la diagonal), corregidos por el método de Bonferroni ( $\alpha = 1.05 \text{ E}^{-07}$ ). Entre paréntesis se indica el porcentaje de recambio..... 27

## RESUMEN

Los ensilados no convencionales son una alternativa de alimentación para el ganado. Para garantizar su inocuidad, calidad y eficacia, se requiere conocer su microbioma, pues la presencia de bacteriófagos afecta la población de bacterias ácido lácticas responsables de la fermentación en el ensilado. Además, dependiendo del material utilizado, contaminación y manejo, es posible que contenga virus patógenos perjudiciales hacia la salud del ganado. Este estudio se centra directamente en el análisis metagenómico de las secuencias virales, extraídas del material genético activo e inactivo de ensilado de *Agave salmiana* mediante fermentaciones espontáneas, utilizando herramientas bioinformáticas con el fin de comprender el papel ecológico de los virus, además de cómo repercuten en la inocuidad y fermentación. Los resultados indican que los fagos asociados a bacterias ácido lácticas predominan durante todo el proceso de fermentación. Fue posible identificar virus patógenos, tanto para el ganado como para el humano, la mayoría procede de contaminación durante el manejo. Finalmente, la etapa de menor carga viral y mayor inocuidad sucede en el ensilado 4 (288 horas). Podemos concluir que el ensilado de *A. salmiana* garantiza inocuidad y es regulado por los fagos de bacterias ácido lácticas.

**Palabras claves:** Ensilados, fermentación, adenoviroma, metagenómica, *Agave salmiana* y fagos de bacterias ácido lácticas

# 1 INTRODUCCIÓN

Los ensilados son procesos de fermentación que conservan y mejoran las características organolépticas del material vegetal con fines alimenticios para el ganado (Garay-Martínez et al, 2024). Normalmente, el proceso se basa en la acción enzimática de bacterias ácido lácticas (BAL) capaces de mejorar la biodisponibilidad de los nutrientes para el ganado (Pérez-Luna et al, 2024). Sin embargo, el microbioma presente en este proceso no se compone exclusivamente de bacterias, sumado al hecho de que a lo largo del tiempo, existe un recambio de los organismos asociados con el ensilado.

La diversidad de microorganismos es variable dependiendo de las condiciones fisicoquímicas del proceso, la contaminación, el manejo de la fuente vegetal, las especies elegidas y un sinnúmero de factores capaces de modificar tanto la composición como las interacciones de la comunidad microbiológica, que incluyen hongos, bacterias, arqueas y virus, entre los que destacan los fagos (Du et al, 2023).

Es normal que los fagos sean los principales virus encontrados en este tipo de fermentos debido a que la mayor parte de la transformación del material vegetal depende de bacterias del filo Bacillota, principalmente del género *Lactobacillus*, así como otros procariotas capaces de llevar a cabo una fermentación ácido láctica, lo que disminuye el pH final del producto. Estos microorganismos son los hospederos principales de un conjunto de fagos especializados, cuya frecuencia se ve favorecida por la acidificación (Wang et al, 2024).

No obstante, dependiendo de si hay infecciones previas del material vegetal, si durante el manejo ingresa material de otros organismos como hongos o insectos, la exposición a contaminación biológica por heces fecales o agua contaminada; es posible encontrar otra composición viral, incluyendo algunos patógenos humanos o de importancia zoonótica (Ruiz-Juárez et al, 2025).

En la mayoría de estas biotecnologías se utiliza material procedente del excedente en la producción de maíz, alfalfa o desechos de deshierbe en pastizales. Pero, en zonas secas, donde el déficit hídrico no genera una cantidad adecuada de materia orgánica, simplemente no se cuenta con el material necesario para el ensilado. Además, el material vegetal disponible en zonas áridas contiene una gran cantidad de metabolitos secundarios, como taninos y saponinas, generados en respuesta al estrés hídrico, pero que para los rumiantes,

podrían resultar en inflamación espumosa y muerte, sumado a la presencia de patógenos que podría comprometer la inocuidad alimenticia de los ensilados (Phelan et al, 2014).

Por lo tanto, en este trabajo se caracterizó el adenoviroma propio del ensilado de bagazo (guishe) procedente de *Agave salmiana*, eliminando previamente el ixtle (fibra), lo que facilita la digestibilidad de los ensilados para la alimentación del ganado. Así, la composición del adenoviroma propio de este material, es un indicador de la inocuidad del fermentado y una herramienta útil para el control del crecimiento bacteriano requerido (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, 1999).

## **2 ANTECEDENTES**

### *2.1 Ensilados*

El ensilaje es una técnica de conservación de materia orgánica, principalmente vegetal, dentro de un silo (un dispositivo que puede ser desde una bolsa, trinchera, cajón, búnker, hasta botes en condiciones herméticas), con el fin de evitar el ingreso de aire, ya que estas condiciones favorecen la acción de las bacterias y hongos que intervienen en la descomposición del material vegetal por fermentación láctica del ensilado (Claudio, 1988).

Durante el proceso, las BAL presentes en el material vegetal tienen un papel fundamental al producir ácido láctico que conservará la energía del forraje y permitirá su conservación a largo plazo.

Existen registros del uso de ensilados para la conservación de alimentos desde hace 300 años, e incluso antes en las culturas más antiguas como la egipcia y la cartaginesa. Durante el siglo XIX, el uso de los ensilados, se popularizó en regiones de Europa, especialmente en Alemania y Gran Bretaña, donde las condiciones climáticas impiden tener forraje para el ganado durante todo el año (Brown, 1880).

Desde ese entonces, la técnica se ha difundido a nivel internacional y la comunidad científica se ha interesado en conocer más sobre el método y cómo mejorarlo. Por ejemplo, el libro *Ensilaje of Green Crops*, del francés Auguste Goffart, 1880 (Citado por Brown, 1880), documenta una investigación acerca de los ensilados de forraje de maíz. La publicación del libro fue de gran interés y tuvo alto impacto en Europa y Norteamérica, incitando a los demás granjeros a replicar su técnica. Posteriormente, varios granjeros de

diferentes regiones, empezaron a compartir sus técnicas de ensilado utilizando diferentes variedades de plantas, principalmente para alimentar a su ganado (Wilkinson et al, 2015).

## 2.2 *Ensilados no convencionales*

Podemos clasificar a los ensilados en dos categorías: ensilados convencionales y no convencionales. Esta diferencia radica en que los primeros se elaboran a partir de plantas cultivadas con el fin de alimentar el ganado, denominadas forrajes. Las principales plantas usadas para ensilar pertenecen al orden Poaceae donde destacan *Zea mays*, *Cenchrus purpureus* y *Medicago sativa*. Estas plantas contienen una gran cantidad de azúcares solubles utilizados por las bacterias en la fermentación del proceso de ensilado. Mientras que los no convencionales utilizan los subproductos y coproductos que no son extraídos directamente del cultivo, incluyendo plantas silvestres abundantes, malezas o desechos como bagazo (residuos fibrosos resultantes de la trituración de materia vegetal fresca) y cáscaras. Utilizó subproductos de cítricos, caña de azúcar, calabaza y yuca, para realizar ensilados no convencionales, con el objetivo de alimentar al ganado en zonas tropicales y subtropicales. Al realizar la evaluación nutricional y de calidad de fermentación de los ensilados, concluyó que son aptos para la alimentación del ganado (Chavira, 2016). En un contraste más objetivo, las leguminosas forrajeras (no convencionales) también han sido comparadas con gramíneas y cereales (convencionales). Entre sus ventajas radica la baja dependencia de insumos de nitrógeno (fertilizantes), alta ingesta voluntaria por parte del ganado y alto contenido de proteína. Aunque se conservan menos tiempo que las hierbas de pastoreo, pueden producir hinchazón en el ganado y dificultad para conservar como ensilado o heno (Phelan et al, 2014).

Otra ventaja de los forrajes no convencionales es su disponibilidad, pues es factible acceder a plantas nativas abundantes sin necesidad de sembrar y fertilizar cultivos para la producción de especies comerciales (trigo, centeno, maíz). Muchas veces, estas pasturas también ofrecen nutrientes diversos y metabolitos secundarios que mejoran la producción de leche y reducen la producción de metano, aunque en todos los casos, se sugiere la combinación con material seco para evitar la fermentación en el rumen que produce la hinchazón espumosa del ganado (Ramírez-Restrepo y Barry, 2005).

### 2.3 Biotecnología del agave

Dentro del territorio mexicano se reportan alrededor de 260 especies del género *Agave*, entre las que destaca *Agave salmiana* o agave pulquero, planta emblemática en México considerada un recurso de alto impacto económico, cultural y nutricional desde tiempos prehispánicos (Blas-Yañez y Thomé-Ortiz, 2021).

Si bien el agave pulquero es cultivado en el centro de México, es el estado de Hidalgo una de las zonas con mayor superficie cultivable (Figueredo-Urbina et al, 2021). La explotación de este agave se basa principalmente en la extracción de aguamiel, pulque y de sus pencas para realizar platillos gastronómicos, además de contar con un gran potencial en sistemas agroecológicos evitando la erosión del suelo agrícola, el control del agua de lluvia a través de la “cosecha de agua”, barreras vivas, formación de bordos y terrazas, también tienen un papel importante en la conservación de biodiversidad ya que es hospedero de animales e insectos (Narváez et al, 2016).

Dentro del área de la biotecnología, se cuenta con estudios del microbioma asociado con los agaves (Coleman-Derr et al, 2015) así como su contenido de probióticos y prebióticos, además de su valor nutricional (Blas-Yañez y Thomé-Ortiz, 2021).

Ocasionalmente, durante la época de secas se ha utilizado el bagazo de maguey o las pencas picadas para alimentar al ganado. Sin embargo, este material presenta una gran concentración de fibra no digerible y de compuestos irritantes como saponinas y oxalacetatos, lo que ocasiona problemas digestivos a los rumiantes e incluso su muerte. Aun así, las pencas y el quiole pueden usarse para alimentar ovejas por su alto contenido de humedad, aunque no como alimento exclusivo pues ocasiona problemas digestivos al ganado (Pinos-Rodríguez et al, 2006). Por ello se sugiere, la eliminación de las fibras (ixtle) para separar el guishe, donde se concentran la mayoría de los nutrientes, la humedad y los metabolitos secundarios (Peña-Rodríguez et al, 2020), sumado a que procesos como el ensilado disminuyen el contenido de saponinas (Pinos-Rodríguez et al, 2008).

El estado de Hidalgo es heterogéneo en su orografía y vegetación englobando tres áreas fisiográficas: la Faja Volcánica Transmexicana, la Llanura Costera del Golfo de México y la Sierra Madre Oriental. Esta variación influye en la distribución de la temperatura y precipitación generando hasta 27 tipos de climas agrupados en tres principales: climas cálidos y semicálidos (húmedos y subhúmedos), climas templados y semifríos (húmedos y

subhúmedos) y climas áridos y semiáridos (Sánchez-Rojas y Bravo-Cadena, 2017). En estos últimos es donde se encuentra la mayor cantidad de especies de agave.

Desafortunadamente, la tendencia global en los últimos 30 años es de un incremento sostenido de la temperatura anual. Para el estado, las proyecciones sugieren que las precipitaciones se incrementarán en zonas altas y se generará un aumento general de temperatura de hasta 2°C para el año 2050 (Pavón y Meza, 2009; Sánchez-Rojas y Bravo-Cadena, 2017). Ante este panorama, las zonas áridas y semiáridas serán las más afectadas por lo que será mucho más difícil cultivar forrajes para el ganado, es por ello que esta propuesta es una alternativa funcional ante la sequía y el cambio climático global ya que *A. salmiana* se encuentra disponible todo el año y es resistente a las condiciones áridas y secas, cuyas áreas de cobertura se expandirán a otras zonas del estado.

El maguey es un patrimonio biocultural en México, las poblaciones silvestres de *Agave salmiana* son afectadas por la sobreexplotación y el desplazamiento de su cultivo por actividades más rentables, incluyendo otros cultivos (Jiménez, 2025). El estado de Hidalgo es el mayor productor nacional de agaves, al que corresponde el 51% de su territorio en sembradíos. En el territorio estatal, se concentra el 78.14% de la producción anual nacional, del cual, 60% es maguey pulquero *A. salmiana*. En el año del 2011 se registró una pérdida de casi el 60% de la planta, por consecuencia de la indiscriminada explotación por los mixioteros para la elaboración de diversos platillos. Los municipios afectados fueron Apan, Epazoyucan, Almoloya, Tepeapulco, Actopan, Zapotlán, Tlanalapa, Emiliano Zapata, Zempoala y Pachuca. Las principales amenazas para el maguey son la depredación de terceros robando, dañando y saqueando los cultivos; extracción del mixiote; depredación de los gusanos rojos y blancos del maguey; el hurto de pencas y plantas completas (Jiménez, 2025). Estas actividades generan una gran cantidad de desechos que se pueden utilizar para la elaboración del ensilado y no ejercer una presión negativa en las poblaciones de dicha planta. Posiblemente se puede combinar con algún otro forraje convencional para aprovechar los desechos de ambos cultivos (Licona et al, 2024)

#### 2.4 Biología de Agave

Los agaves son plantas monocotiledóneas, rosetófilas, suculentas y monocárpicas (Figueredo-Urbina et al, 2021). Taxonómicamente pertenecen a la familia Asparagaceae,

subfamilia Agavoidiae. Morfológicamente los magueyes son descritos como plantas de hojas en roseta, gruesas y carnosas, dispuestas sobre un tallo corto (piña), conocidas comúnmente como pencas.

En México se encuentran concentrados alrededor de 76% de las especies de agave, donde se distribuyen principalmente en las zonas del Valle de Tehuacán- Cuicatlán, entre los estados de Oaxaca y Puebla y en la Barranca de Metztitlán-Hidalgo (Figueredo-Urbina et al, 2021).

Hidalgo es un estado con un número considerable de magueyes, cuenta con 26 especies de alta probabilidad de encontrarse de manera natural en el estado, aunque hay reportes de al menos otras 29 especies cultivadas, introducidas como plantas de ornato o sin una adecuada definición taxonómica. Entre las especies más abundantes de Hidalgo encontramos *A. mitis*, *A. lechuguilla* y *A. salmiana*. Tres grandes zonas del estado resaltan por su riqueza de agaves: planicie central, barranca de Metztitlán, y Valle de Mezquital, regiones con gran potencial para manejo e implementación de proyectos biotecnológicos basados en estas plantas (García-Montes et al, 2024).

### 2.5 Análisis de viromas

Un viroma se compone por la totalidad de virus, asociados tanto con eucariotas y procariotas, de una muestra biológica, ambiental e incluso industrial (Cadwell, 2017; Zárate et al, 2017). Sin embargo, en la mayoría de los casos, la cantidad y diversidad de virus asociados con plantas se subestima por tres razones principales: la elección del material genético, ya sea ácido desoxirribonucleico o ribonucleico (ADN o RNA), la variación del entorno en que se toman las muestras y la precisión de las herramientas metodológicas para la secuenciación, por lo que podemos dividir los viromas en Adenoviromas y Retroviromas (Ma, 2019).

Los bacteriofagos son virus exclusivos de procariotas con una dependencia intracelular obligada. Su material genético está constituido normalmente por ADN, aunque algunos grupos pueden tener RNA como BF23, F2, R17, PhiCb5, PhiCb12r, PhiCb8r, PhiCb23r, PP7, Q BETA PHAGE, MS2 PHAGE, y PHAGE PHI 6 (Da Poian, et al, 1993; Poma et al, 2012). Poseen un tamaño entre 20 a 200 nanómetros y son los organismos más abundantes en los ecosistemas. Estos virus interactúan directamente con su bacteria hospedera, afectando su abundancia, virulencia y fisiología. Su mecanismo de infección se

basa en la interacción de los virus con estructuras bacterianas llamadas pilis, siendo particulares para cierto tipo de fagos. Posteriormente inyectan su material genético en las bacterias con el objetivo de transcribir información para la producción de enzimas, toxinas, proteínas estructurales y funcionales del virus y participan en la transferencia de genes entre bacterias.

Los fagos presentan dos estados funcionales, el estado lítico o virulento, que consiste en la replicación del fago ocasionando la lisis de la bacteria hospedera con el objetivo de liberar nuevos fagos, y el estado de profago o temperado, en el cual el fago se instala en el cromosoma bacteriano, replicándose junto a la célula hospedera con el objetivo de liberar nuevos fagos; y el estado lisogénico de profago o temperado, en el cual el fago se instala en el cromosoma bacteriano, replicándose junto al hospedero y transmitiendo su material genético a las bacterias hijas sin ocasionar la lisis del hospedero, encontrándose en un estado lisogénico hasta que algún cambio fisiológico de la bacteria o una coinfección lo activa nuevamente (Navarrete, 2020).

Los fagos se agrupan en 14 a 22 familias oficialmente aceptadas y varias más que esperan su asignación taxonómica (Adriaenssens et al, 2020). La mayoría tienen ADN como material genético ya sea con cadenas dobles (dsDNA) o simples (ssDNA) (Xia y Yuen, 2005), por lo que se pueden agrupar en los tipos I y II de Baltimore (Koonin et al, 2021). Por ello, en este trabajo se ha optado por secuenciar el adenoviroma, dejando de lado el retroviroma ya que para el proceso de fermentación en ensilados, los fagos de ADN constituyen el principal grupo modulador de la actividad ácido láctica.

Anteriormente se han descrito fagos relacionados a bacterias ácido lácticas, particularmente en la industria láctea, donde se han clasificado diferentes grupos a través de 70 secuencias de genomas: 1) Fagos lácticos, 2) Fagos de *Streptococcus thermophilus*, 3) Fagos de *Leuconostocs*, y 4) Fagos de lactobacilos. Existen ciertas limitaciones para la clasificación de los fagos puesto que comparten algunas secuencias no necesariamente relacionadas filogenéticamente. Además, muchas veces se cuenta solo con un fago para representar una especie completa, existe la carencia de aislados de fagos y por último, los métodos de clasificación taxonómica empleados no son tan precisos y poseen un tiempo de cómputo prolongado (Mahony y Van Sinderen, 2014).

En un estudio realizado con ensilados de alfalfa, provenientes de diferentes granjas, se investigó la metagenómica viral dentro del mismo (Wang et al. 2024). En la metodología, realizan la extracción manual del ADN con el objetivo de identificar las secuencias de fagos. Se utilizaron los softwares ChecV y Visorter 2, logrando clasificar 24 órdenes de fagos, donde predominan Claudovirales y Geplafuvirales, aunque también se encontraron fagos no identificados actualmente. El estudio analizó los tipos de fagos, utilizando el programa PhaTYP, encontrando que los fagos virulentos de procariontes predominan en el ensilado, por su supervivencia y su capacidad de abarcar un mayor número de hospederos. Por otro lado, los fagos desempeñan un papel en la regulación del metabolismo de carbono en el ensilado, como lo indican los genes compartidos involucrados entre los fagos y las bacterias.

## 2.6 *Virus asociados con agaves*

Aunque el agave sea una planta emblemática con alto valor económico, biológico y cultural en México, existen pocas investigaciones acerca de la diversidad de virus que lo habitan. En el estado de Paraíba-Brasil, se tomaron muestras de varias partes de plantas adultas de 7 años de edad, de las especies *Agave sisalana*, *A. fourcroydes*, y el Agave híbrido identificado como 11648; con el objetivo de identificar su diversidad viral mediante la meta transcriptómica. Se utilizaron secuencias profundas de ARN, para identificar los viomas de las tres especies, identificando 25 especies virales de las familias Alfa y Betaflexivirus, Botourmiavirus, Closterovirus, Ribovirus y Virgavirus, así como varios otros con dsRNA (ARN de doble cadena) (Quintanilha-Peixoto et al. 2021). Solo una especie estaba clasificada, el virus moteado leve de caupí (CPMMV). Esto nos da una idea de la gran cantidad de especies virales no clasificadas aún y del trabajo por hacer. Señalamos también que este es un retroviroma, por lo que no es posible identificar estos componentes de la comunidad viral en nuestro trabajo.

En México se cuentan con estudios puntuales para la identificación de virus asociados con fitopatologías en agave, por ejemplo, el virus del mosaico tuberoso suave (TuMMV) en *Agave attenuata* y *A. amica* (Torre-Almaraz et al, 2023) y el virus de estría amarilla en *A. tequilana* (Torre-Almaraz et al, 2024). Pero estos son aislamientos únicos que no consideran las interacciones de la comunidad microbiana por lo que no pueden considerarse como viomas.

## 2.7 Fagos y ensilados

Los fagos y sus bacterias hospederas interactúan de forma dinámica a lo largo del tiempo, lo que produce recambios y coevolución dentro del microbioma. Dentro de estas relaciones se observa que la coevolución es un resultado común, más no universal, pues la relación bacteria-fago depende en gran medida de las condiciones ambientales. Por último, el proceso de coevolución puede afectar la diversidad de bacterias y fagos desde el nivel de genomas hasta las comunidades. Desde la perspectiva de ecología comunitaria, los fagos pueden mediar la competencia entre especies bacterianas (Koskella y Brockhurst, 2014).

Las bacterias ácido lácticas son abundantes en los ensilados, las cuales son susceptibles a las infecciones por fagos pertenecientes al orden Caudovirales, mayormente de la familia Siphoviridae, utilizadas principalmente como indicadores de la eficiencia de fermentación en la industria láctea (Mahony y Van Sinderen, 2014). Varios trabajos resaltan la diversidad del viroma en los ensilados (Tabla 1), dependiendo en parte de la técnica de secuenciación utilizada o del material vegetal.

**Tabla 1.** Diversidad del viroma asociado con ensilados.

Viroma	Ensilado	Técnica de secuenciación	Cita
Autographiviridae, Azeredoviridae, Bronfenbrennervirinae, Caudovirales, Chaseviridae, Efquatrovirus, Fernvirus, Gracegardnervirinae, Hendrixvirinae, Herellevirinae, Mccleskeyvirinae, Obolenskivirus, Peduoviridae, Phycodnaviridae, Queuoviridae, Sepvirinae, Skunavirus, Stephanstirmviridane, Travirus	Ryegras <i>Lolium multiflorum</i>	Metagenómica de secuencias ensambladas < 1000 pb	Sáenz et al, 2023
Alphapartitivirus, Amalgaviridae, Emaravirus, Orthotospovirus, Partitiviridae	<i>Medicago sativa</i>	Secuenciación de retrotranscritos dsRNA con primer aleatorios	Samarfard et al, 2020

Caudovirales Geplafuvirales	<i>Medicago sativa</i>	Metagenómica de secuencias ensambladas < 1000 pb	Wang et al, 2024
--------------------------------	------------------------	---	------------------

## 2.8 Inocuidad alimentaria

La inocuidad alimentaria se define como la garantía de que los alimentos que se consuman no causarán daño a la salud, es decir, que durante su producción se aplicaron medidas de higiene para reducir el riesgo de que los alimentos se contaminen con residuos de plaguicidas, metales pesados, agentes físicos que puedan causar una lesión al momento de consumir un alimento y sobre todo, microorganismos como bacterias y virus, que puedan enfermar al consumidor animal o humano (SENASICA, 2024). Es importante destacar que muchos brotes de enfermedades transmitidas por alimentos se producen por malas prácticas durante su manipulación o almacenamiento (da Cunha, 2021).

La evaluación de la inocuidad cuenta con varios trabajos en las industrias de lácteos (Cusato et al, 2013) y cárnica (Jianu y Golet, 2014). Sin embargo, existen pocas investigaciones sobre alimentos de origen vegetal con fines agropecuarios y en muy pocos se considera el viroma como un indicador de inocuidad. Por ejemplo, la evaluación del viroma en carne (ave, ternera y cerdo), pescados, mariscos y algunas verduras (lechuga, pepino y espinaca) mostró la presencia de familias de bacteriófagos, con mayor prevalencia en mariscos y espinacas, en el estudio también se identificaron genes de resistencia a antibióticos procedentes de bacterias (Blanco-Picazo et al, 2022). Este trabajo denota en principio que los fagos son un excelente indicador de la composición bacteriana asociada con los alimentos, por lo tanto, su prevalencia puede asociarse con la inocuidad alimentaria.

Con relación a los ensilados, en el estudio realizado por Lewis et al. (2020); se aislaron fagos a partir de heces de oveja capaces de aplicarse en la seguridad alimentaria. Los aislamientos se inocularon en ensilado de maíz y pasto, estos fueron capaces de infectar al hospedero *Klebsiella aerogenes*, identificada como la bacteria patógena que ocasiona diarrea en las ovejas. El responsable de este control fue el fago N1M2, descrito por primera vez en este trabajo y reconocido como un fago gigante, con la capacidad de destruir a esta bacteria y por lo tanto eliminar la patogenicidad. Entonces, la inoculación de los ensilados con N1M2,

elimina al patógeno *K. aerogenes* garantizando la inocuidad del alimento fermentado e incluso con un potencial tratamiento para infecciones activas de *Klebsiella*.

Por otro lado, el análisis de viomas se puede emplear en el desarrollo de estrategias y políticas de bioseguridad, incluida la implementación de evaluaciones de riesgo para respaldar la regulación, garantizar la inocuidad y reducir el movimiento de materiales vegetales infectados. La gestión de riesgos agrícolas puede incorporar información del viroma para el monitoreo de virus nuevos y conocidos en todas las escalas, lo que permite identificar rápidamente virus agrícolas y de importancia en salud para comprender su abundancia y propagación (Alcalá et al, 2023).

Finalmente, aún con la predominancia de fagos en los ensilados, no se descarta la presencia de otros virus patógenos o indicadores de los procesos de fermentación y recambio; que pudieran servir ya sea para mejorar los procesos, así como garantizar la inocuidad del viroma para el ganado y los humanos expuestos durante el manejo del material.

### **3 JUSTIFICACIÓN**

En ensilados de plantas forrajeras bien conservadas y microbiológicamente caracterizadas, el valor nutrimental garantiza el aprovechamiento por parte del ganado. Sin embargo, esto depende de la disposición de material vegetal para ensilar que no siempre está garantizada a lo largo del año. Por esta razón, se han buscado alternativas a los forrajes convencionales, como los magueyes, ya sean cultivados o silvestres. Sus características biológicas como la resistencia a la sequía, su capacidad para crecer en suelos pobres y su crecimiento relativamente constante, con incrementos vegetativos que aumentan su biomasa, los convierten en una opción viable y adecuada para garantizar la fuente de alimento para el ganado.

No obstante, la palatabilidad, calidad alimentaria e inocuidad de los ensilados están determinadas por los microorganismos y sus interacciones presentes antes, durante y al final del proceso, siendo las BAL el principal componente de la comunidad microbiológica asociado a procesos fermentativos exitosos con productos de alta conservación de energía, mejor disponibilidad de nutrientes e inocuos. Pero, el papel de otras poblaciones en el microbioma del ensilado, como los virus, puede afectar su calidad e inocuidad. En este sentido, los ensilados no convencionales como el caso de *A. salmiana* no han sido caracterizados en cuanto a su microbiota asociada, ni se ha reportado la presencia de virus ni su posible impacto en la fermentación o la salud de humanos y ganado.

Por lo anterior, esta propuesta caracterizará a través de metagenómica una parte del microbioma del agave ensilado, el adenoviroma, para determinar su inocuidad, así como las asociaciones predominantes y su posible función con el resto del microbioma.

### **4 HIPÓTESIS**

Poco se conoce el papel de los virus dentro de los ensilados, sin embargo, está demostrado que su presencia regula la diversidad de bacterias y arqueas en fermentaciones controladas, como en la industria de los lácteos. Además, algunos fagos pueden disminuir la eficiencia de la fermentación. Por otro lado, el material vegetal puede incluir algunos adenovirus fitopatógenos en el ensilado, dependiendo de la calidad de las plantas y del manejo del material. Por lo tanto, si la extracción ADN incluye a una muestra del microbioma activo o

inactivo del ensilado; entonces será posible determinar qué virus modifican la fermentación y la inocuidad del alimento.

## **5 OBJETIVO GENERAL**

Analizar las secuencias virales extraídas de ensilados de *Agave salmiana*, mediante secuenciación metagenómica tipo shotgun; para evaluar su impacto en la inocuidad alimenticia del ganado.

## **6 OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Extraer el metagenoma de ensilados de *Agave salmiana*, mediante lavados con detergentes y precipitación con cloroformo-alcohol isoamílico; para garantizar un material genético de calidad suficiente para la secuenciación.
2. Analizar las secuencias específicas del adenoviroma, obtenida por secuenciación de nueva generación; para determinar los cambios a través del tiempo de la comunidad específica e identificar los fagos con potencial para el desarrollo biotecnológico, así como otros virus que pudiesen comprometer la inocuidad alimentaria del ensilado.

## **7 MATERIALES Y MÉTODOS**

### *7.1 Ensilados*

El material vegetal para ensilar consistió en pencas de *Agave salmiana* recolectadas en las inmediaciones del Distrito de Educación, Salud, Ciencia, Tecnología e Innovación (DESCTI) en el municipio de San Agustín Tlaxiaca, Hidalgo, México (20°06'47.4"N 98°49'44.2"W). Los ejemplares seleccionados para cosecha corresponden a individuos sin manejo o intervención humana de dos o más metros de altura. Las pencas a cortar se seleccionaron de acuerdo con los siguientes criterios: pencas sanas sin indicios de enfermedad como manchas o marchitez, pencas que no estuvieran en contacto directo con el suelo y pencas sin daño mecánico ambiental o biológico. Una vez seleccionadas, las pencas se cortaron lo más cerca posible del tallo y se eliminaron las espinas para su traslado a la Unidad Regional Hidalgo del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. (CIAD URH).

Una vez en las instalaciones del CIAD URH, las pencas se desfibraron manualmente. Cada penca se cortó longitudinalmente por la mitad y se machacaron con ayuda de un bat para béisbol de madera, sin perforar o romper las hojas. Una vez procesadas, cada penca se raspo con un machete eliminando la parte fibrosa (ixtle) del resto del material vegetal (guishe), del cual se generaron 20 kg (Figura 1).



**Figura 1. Proceso de separación del ixtle para la obtención del guishe de *Agave salmiana*.**

Seis microsilos de cloruro de polivinilo (PVC) lavados/desinfectados con jabón comercial y una solución con cloro comercial al 4%, se dejaron secar por 24 horas. En cada uno se colocaron dos kilos de guishe y se comprimió con ayuda de un tornillo sin fin con tapa incorporado en el diseño del microsilo (Figura 2) para reducir la cantidad de agua y retirar la mayor cantidad de aire. Los microsilos se dejaron fermentar a temperatura ambiente (12-20 °C), lejos de la luz solar. Se tomaron muestras para secuenciación a las 16 horas de iniciada la fermentación (T1), a las 72 horas (T2), a las 164 horas (T3), a las 288 horas (T4) y a las 720 horas (T5).



**Figura 2.** Microsilos de PVC. Del lado derecho se observa el tornillo para compresión del material que elimina la mayor cantidad del agua en la muestra.

Después de los cinco tiempos, los microsilos se abrieron en una campana de flujo laminar vertical para evitar contaminación cruzada con el ambiente. Cinco centímetros de la parte superior del ensilado fueron removidos, el resto del maguey ensilado fue depositado en bolsas estériles para muestreo y congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso (Figura 3).



**Figura 3.** Ensilados con diferente tiempo de fermentación, panel izquierdo: material vegetal sin ensilar (guishe), panel derecho: agave ensilado por 30 días.

## 7.2 *Extracción del DNA*

### 7.2.1 *Aislamiento del microbioma*

Los microorganismos se desprendieron de los ensilados realizando un lavado con una solución tamponada pH 8 (PBS: 9.32  $\mu$ l de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> al 1 M + 0.68  $\mu$ l de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> al 1 M, aforado a 100  $\mu$ l), 90  $\mu$ l de PBS más 10 gramos de la muestra en un matraz Erlenmeyer de 250  $\mu$ l (1 a 9 v/v), la solución se agito con agitador imantado a 260 rpm durante una hora, a 26°C (Pich & Schubert, 1993).

Posteriormente, la solución se pasó a través de un filtro Whatman con un tamaño de poro de 11 micras, el contenido filtrado se distribuyó en tubos plásticos de 50  $\mu$ l estériles. Los tubos se llevaron a centrifugación 10 000 rpm durante 8 minutos a 4°C para precipitar y aislar a los microorganismos y virus del resto de la solución. Una vez terminado el proceso, la pastilla formada se conservó y el sobrenadante fue desechado, los tubos se conservaron en congelamiento a -70°C hasta su uso.

### 7.2.2 *Purificación y concentración del microbioma*

Con fines de purificar la muestra y mejorar la lisis celular a cada tubo plástico se le agregaron 5  $\mu$ l de una solución de cloruro de potasio y PVP (polivinilpirrolidona), se homogeneizaron en vórtex durante 2 min y se llevaron a centrifugación 10 000 rpm, 8 min, 4°C, recuperando la pastilla y desechando sobrenadante, el proceso se llevó a cabo dos veces. La pastilla final se conservó a -70°C hasta su uso para la extracción de ADN.

### 7.2.3 *Lisis y recuperación del material genético*

Para llevar a cabo la extracción de ADN, se utilizó el protocolo modular de Lever et al. (2015) modificado de la siguiente manera: Se añadieron 500  $\mu$ l de solución de lisis (Tris HCL 300 mM, Guanidinium HCL 800 mM, EDTA 30 mM, Triton 0.5% a pH 10) a 200  $\mu$ l del material biológico previamente purificado y concentrado, como se describió anteriormente. Luego, las muestras se congelaron y descongelaron dos veces y se calentaron durante 1 h a 50°C, se añadieron 0.3 g de perlas de vidrio de 100 micrones y se agitaron en vórtex a máxima velocidad durante 10 minutos y se centrifugaron a 10 000 rpm durante 20 minutos a 4°C.

Los sobrenadantes se recuperaron y se transfirieron a nuevos microtubos, agregando un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), posteriormente se centrifugaron a 10 000 rpm durante 10 min a 4°C. Todos los sobrenadantes se recuperaron y se les adicionó 6 µl de RNAsa (Invitrogen: P/N 46-7286) y se incubaron durante 15 min a 37°C. La RNAsa fue eliminada repitiendo el proceso, pero sin agregar nuevamente RNAsa.

Para la precipitación de ADN, se tomaron 400 µl de los sobrenadantes y se añadieron a una solución de 100 µl PEG (polietilenglicol) 6000 al 30% y 50 µl de NaCl 5 M, la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante dos horas. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 16 000 rpm durante 15 min a 4°C; se descartaron los sobrenadantes, y el pellet se lavó dos veces con etanol al 80% (12 000 xg, 5 min, 4°C). Los pellets se secaron al aire en campana de flujo laminar para posteriormente añadir 50 µl de solución amortiguadora TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8) y se incubaron a 42°C durante dos horas para la disolución del pellet.

La concentración y pureza del ADN se midió en un NanoDrop™ One (Thermo Scientific, índice de absorbancia a 260/230 nm) y la integridad se evaluó por electroforesis (gel de agarosa: 1%; voltaje: 150 V; tiempo de electroforesis: 40 min). Las muestras se almacenaron a -80°C hasta la secuenciación.

### *7.3 Secuenciación de las muestras*

Las muestras de material genético se enviaron a las instalaciones de BGI genomics (China Corp) para su secuenciación en segmentos de 150 pb, con 5 GB por muestra (Sistema de Secuenciación DNBSEQ/Illumina). Para evaluar el adenoviroma de los silares, las secuencias obtenidas fueron limpiadas eliminando fragmentos menores de 150 pb y eliminando el segmento de adaptador añadido. Para el alineamiento solo se consideraron secuencias con un contenido menor de 0.1% de nucleótidos no identificados (N) lo que constituye un aproximado del 40% del total de secuencias obtenidas. Esto se realizó con el software SOAPnuke, desarrollado por BGI, los parámetros utilizados para el filtro fueron “-n0.001-l20-q0.4-adaMis3-minReadLen150”. La calidad de la secuencia (SQ) se obtuvo con la fórmula:  $SQ = -10 * (\log(E/1-E)/\log 10)$ ; donde  $E = Y/(1+Y)$ , y  $Y = SQ/e^{(-10 * \log 10)}$ . Solo aquellas secuencias con una calidad superior a 42 fueron tomadas en cuenta para el análisis (Chen et al, 2018).

#### *7.4 Procesamiento bioinformático*

Los procesos bioinformáticos se realizaron en el entorno virtual Anaconda versión 24.5.0 para Linux Ubuntu (versión 24.04 LTS). Se utilizó la plataforma bioinformática Qiime2 de código abierto (versión 2024.5), es un pipeline para el análisis de metataxonomía. Contiene herramientas para limpiar secuencia, agrupar, asignación taxonomía, reconstruir filogenias, inferir métricas de diversidad y abundancia diferencial. Con la interfaz Galaxy, no es necesario saber programar en la consola, ya que al escoger la herramienta lo realiza automáticamente de manera eficiente. El uso de amplicones proporciona una amplia funcionalidad analítica para respaldar el análisis de genes marcadores de microbioma a partir de datos de secuenciación sin procesar a través de publicaciones, visualizaciones de calidad y estadísticas (<https://qiime2.org/>). Se importaron las secuencias a Qiime2 en formato FASTAQ, posteriormente se transformaron en formato FASTA para hacer uso de las demás herramientas.

#### *7.5 Asignación taxonómica*

Para identificar la composición de la comunidad del ADN viroma (fagos y el resto de los virus del ensilado), se utilizó MetaPhuIUN 4.0, que se basa en ~5,1 millones de genes marcadores únicos específicos de clados, dentro del grupo; identificados a partir de ~1 millón de genomas virales (~236 600 referencias y 771 500 genomas metagenómicos ensamblados) que abarcan 26 970 bins genómicos a nivel de especie (SGB) (Pasolli et al, 2019). Se asignaron nombre a las Unidades Taxonómicas Operativas (OTUs, por sus siglas inglés) a través de la herramienta Kraken taxonomic (abundances), para identificar los virus hasta un nivel de especie, tanto los fagos propios de bacterias ácido lácticas como los virus con potencial patógeno. Con la herramienta kraken-mpa-report se resumió el recuento de lecturas en todos los niveles taxonómicos dentro de la muestra para establecer la abundancia, representatividad y la probabilidad de pertenencia.

#### *7.6 Análisis estadístico*

Debido a la cantidad excesiva de OTUs obtenidos, es necesario depurar la lista taxonómica en donde se encuentran tanto fagos como virus de importancia médica y veterinaria, además de fitopatógenos y cualquier otro virus que haya contaminado la muestra. Nuestro primer

criterio de depuración fue la redundancia de secuencias 5'-3' y 3'-5' (forward y reverse), obtenidas por la herramienta kraken taxonomic (abundances). Las OTUs listadas con ambos tipos de secuencias se consideran virus activos, es decir, aquellos que presentan secuencias listas para transcribir (solo forwards) y genomas listos para encapsularse (tanto forward como reverse en dsDNA) en los ensilados.

Posteriormente, la abundancia de secuencias, sumando tanto forward como reverse por unidad taxonómica, se usaron para calcular el promedio de transcritos por OTU, con lo que se calculó la probabilidad de presencia/abundancia de cada virus, que constituye nuestro segundo criterio de elección. Para ello se usó la fórmula de Poisson:  $(e^{-\lambda} \lambda^x) / x!$ ; donde “e” equivale a la constante de avogadro 2.71828, “ $\lambda$ ” equivale al promedio de transcritos por OTU, “x” es la cantidad de transcrito por OTU específica y “x!” es la factorial de la cantidad de los transcritos. El valor de corte probabilístico fue ajustado mediante el método de Bonferroni, que consiste en dividir la probabilidad de error aceptable ( $\alpha = 0.05$ ) entre el total de secuencias del adenovirus. El proceso se realizó por cada tratamiento de ensilado (Wasserman 2004).

Nuestro tercer criterio de elección fue la patogenicidad, sobre todo para garantizar la inocuidad alimenticia de los ensilados (Mahony y Van Sinderen, 2022; Sadurski et al, 2024; Wang et al, 2024). Para ello se identificaron virus patógenos en humanos y otras especies animales, por ensilado; mediante su identificación por ID en el GenBank (NCBI Resource Coordinators, 2016). La base depurada, por ensilado, resultante considera entonces a los virus activos, más abundantes y con potencial patógeno. Cabe resaltar que estos son criterios propios basados en las experiencias y recomendaciones de otros análisis metagenómicos (Martínez-Puchol et al. 2020), donde la inclusión de especies poco frecuentes obedece a su importancia como potenciales fuentes de contaminación, por lo tanto, obtener un análisis estadístico de frecuencias así como la identidad de patógenos activos fue prioritario para nosotros. Esta base se utilizó para los análisis de diversidad e importancia.

### *7.7 Análisis de diversidad*

Se evaluó la importancia por ensilado de los OTUs obtenidos, considerando los tres criterios de inclusión; mediante el criterio de Macintosh (1981)  $D = (N-U)/(N-\sqrt{N})$ , donde D corresponde con el índice de importancia en la muestra, cuyo valor fluctúa alrededor de la

unidad, valores inferiores a uno tienen una adecuada cobertura de abundancia de la muestra. N es el total de secuencias en la lista, y U es la abundancia de una secuencia específica dentro de la muestra.

La diversidad alfa proporcional de los ensilados se calculó mediante el Índice de Shannon-Wiener  $H = -\sum pi * \ln(pi)$ , donde  $\Sigma$  es la suma total de los segmentos de cada uno de los OTUs contenidas en todos los ensilados,  $\ln$  es logaritmo natural, y  $pi$  es el contenido total de las especies (Moreno, 2001). Con las listas obtenidas se calcularon las tasas de recambio (diversidad beta) en el tiempo, así como la proporción de las especies compartidas entre ensilados (Índice de similitud de Jaccard), los cuales se compararon con una prueba de Friedman. Visualmente, estos arreglos se ordenaron mediante un Análisis No Métrico Dimensional (NMDS) con un criterio de estrés menor al 0.1 y coeficientes de correlación significativos. Los análisis se realizaron con el programa PAST 4.05 (Hammer et al, 2001).

La presentación visual de los datos se realizó utilizando solo los OTUs identificados por el índice de Macintosh, considerando la suma total de las secuencias como el 100% y el conteo de segmentos por especie una proporción del total.

## **8 RESULTADOS**

### *8.1 Diversidad Alfa*

Se identificaron un total de 588 OTU's pertenecientes a todas las muestras, de los cuales solo 37 ( $\cong$  6% de la diversidad total) fueron representativos en los ensilados ( $D < 1$ ) de acuerdo con el índice de Macintosh, 18 de ellos tienen una representatividad mayor al 1 % de las secuencias (Figura 4).

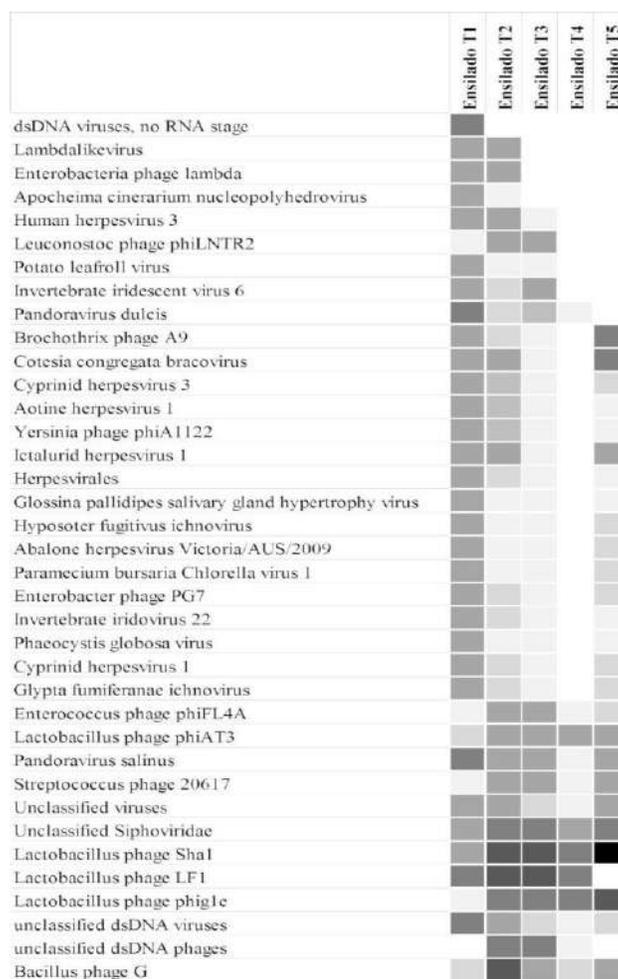


T2: 72, T3: 164, T4: 288, T5: 720 horas. TsxE: Total de segmentos por ensilado. IM: Índice de Macintosh. %: Porcentaje del total de secuencias.

OTU's	T1	T2	T3	T4	T5	TSxE	IM	%
Fago Sha1 de <i>Lactobacillus</i> *	34	4151	12339	2118	44709	63351	0,734	29.10
Fago LF1 de <i>Lactobacillus</i> *	66	14593	10700	65	3498	28922	0,879	13.28
Fago phiAT3 de <i>Lactobacillus</i> *	28	2128	8314	99	9394	19963	0,917	9.17
Fago phig1e de <i>Lactobacillus</i> *	5	1022	2795	411	12553	16786	0,931	7.71
<i>Pandoravirus dulcis</i>	11637	183	42	1	0	11863	0,951	5.45
<i>Pandoravirus salinus</i> *	11242	139	53	3	163	11600	0,952	5.33
Virus dsADN, sin estadio de RNA	10976	0	0	0	0	10976	0,955	5.04
Virus de dsADN no clasificado*	5673	70	28	1	18	5790	0,977	2.66
Fago de dsADN	0	2942	1239	7	0	4188	0,984	1.92
Fago phiFL4A de <i>Enterococcus</i> *	2	2686	1275	7	30	4000	0,985	1.84
Bracovirus de <i>Cotesia congregata</i>	3759	71	6	0	75	3911	0,985	1.80
Fago 20617 de <i>Streptococcus</i> *	4	2279	1493	5	74	3855	0,985	1.77
Virus parecido a Lambda	2774	741	0	0	0	3515	0,987	1.61
Ictalurid herpesvirus 1	2965	33	6	0	40	3044	0,989	1.40
Fago lambda de enterobacterias	1347	1344	0	0	0	2691	0,99	1.24
Virus iridisente 6 de invertebrados	2529	32	58	0	0	2619	0,99	1.20
Herpesvirus Victoria Abalone AUS/2009	2093	7	6	0	33	2139	0,993	0.98
Herpesvirus humano 3	2032	42	4	0	0	2078	0,993	0.95
Virus no determinado*	1521	66	28	1	52	1668	0,994	0.77
<i>Glypta funiferanae</i> ichnovirus	1520	19	5	0	37	1581	0,995	0.73
<i>Aotina</i> herpesvirus 1	1333	19	3	0	1	1356	0,996	0.62
Fago phiA1122 de <i>Yersinia</i>	1231	21	5	0	2	1259	0,996	0.58
Cyprinid herpesvirus 3	1026	12	2	0	17	1057	0,997	0.49
Virus de papa "leaf roll" (Rolla de hoja)	841	7	2	0	0	850	0,998	0.39
Herpesvirales	796	11	2	0	6	815	0,998	0.37
Fago phiLNTR2 de <i>Leuconostoc</i>	1	341	462	0	0	804	0,998	0.37
<i>Apocheima cinerarium</i> nucleopolyhedrovirus	737	9	0	0	0	746	0,998	0.34
Fago PG7 de <i>Enterobacter</i>	689	17	2	0	26	734	0,998	0.34
Siphoviridae no clasificado*	17	282	244	38	152	733	0,998	0.34
Iridovirus 22 de invertebrados	705	10	2	0	3	720	0,999	0.33

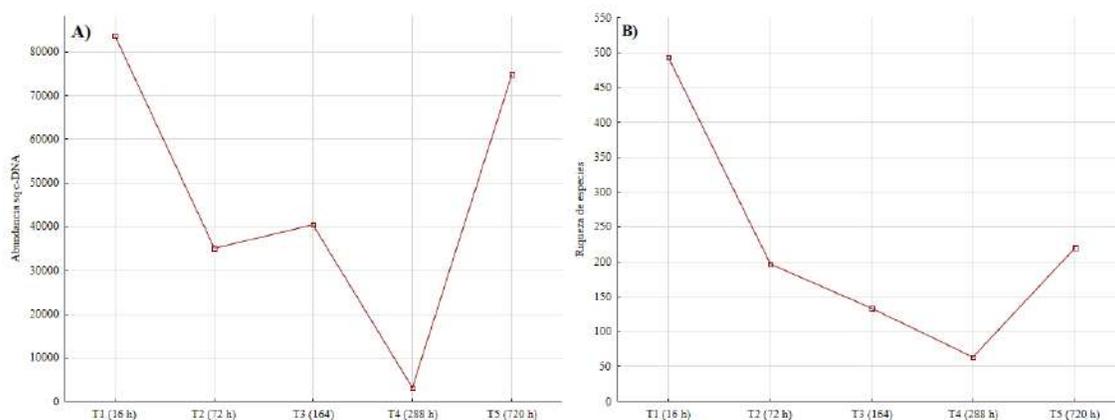
Herpesvirus 1 de Ciprinidos	639	19	4	0	46	708	0,999	0.33
Fago A9 de <i>Brochothrix</i>	500	13	2	0	127	642	0,999	0.29
Virus de <i>Phaeocystis globosa</i>	595	8	1	0	9	613	0,999	0.28
Virus 1 de <i>Paramecium bursaria</i> / <i>Chlorella</i>	528	4	4	0	25	561	0,999	0.26
<i>Hyposoter fugitivus</i> ichnovirus	506	6	2	0	32	546	0,999	0.25
<i>Bacillus</i> phage G *	14	46	122	12	344	538	0,999	0.25
Virus de glándula salival de <i>Glossina pallidipes</i>	500	4	2	0	3	509	0,999	0.23

En general, los fagos son poco abundantes en el ensilado de 16 horas e incrementan paulatinamente su abundancia, con excepción del fago de *Lactobacillus LF1* que desaparece al tiempo 5 (Figura 5).



**Figura 5.** Gráfico de abundancia seriada con los 37 OTUs dominantes en los ensilados de *Agave salmiana*. Las tonalidades más oscuras tienen una mayor cantidad de secuencias dentro de las muestras, mientras que las tonalidades más claras tienen menos.

El ensilado de 16 horas tiene un índice de Shannon-Wiener  $H = 0.044$ , a las 72 horas  $H = 0.01$ , a las 164 horas  $H = 0.008$ , a las 288 horas  $H = 0.0003$ , lo que indica una caída gradual de abundancia y riqueza, con un repunte a las 720 horas con  $H = 0.023$ . Resalta la caída menos abrupta de riqueza con relación a la abundancia, lo que indica que la composición viral es más estable con respecto a la cantidad de transcritos, mientras que la menor carga viral se alcanza a las 288 horas (Figura 6).



**Figura 6.** Abundancia (A) y riqueza (B) del viroma asociado con ensilados de *Agave salmiana*, en diferentes tiempos.

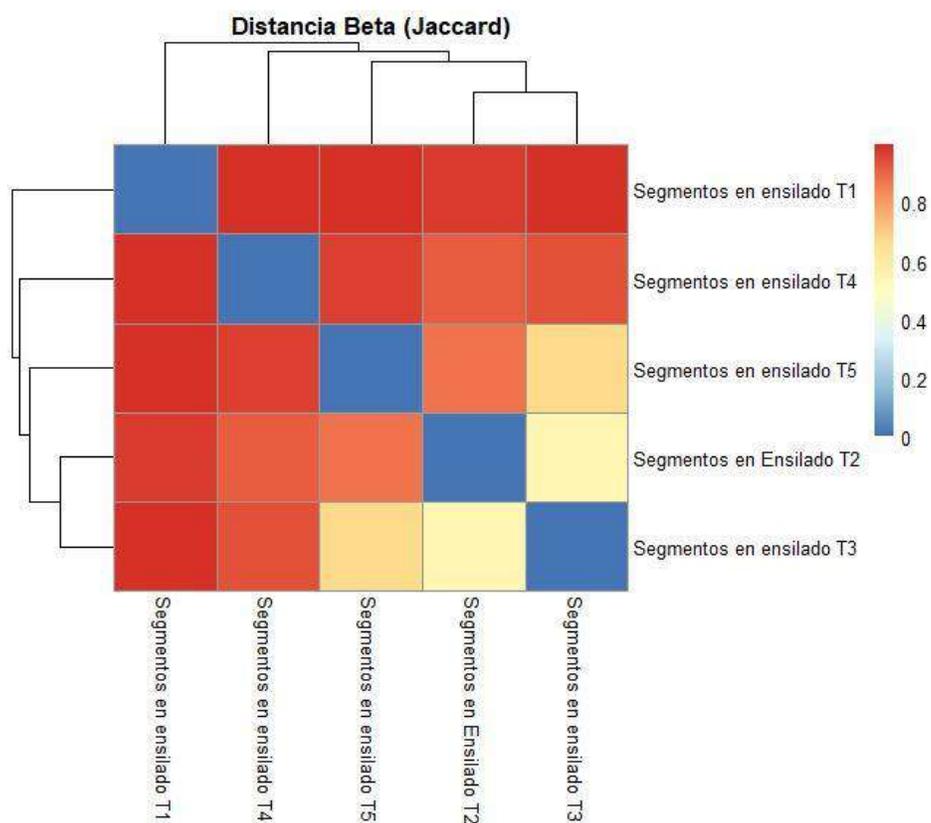
Los virus más abundantes son los fagos de lactobacilos, donde *Lactobacillus phage Sha1* es la especie dominante, seguido de *Lactobacillus phage LF1* aunque solo en los primeros cuatro tiempos, *Lactobacillus phage phiAT3* está presente en todos los ensilados y *Lactobacillus phage phig1e* es menos abundante al tiempo 1. En conjunto, integran el 59.26% del total de la biodiversidad. El género *Pandoravirus* (10%) es el segundo más abundante, las especies *Pandoravirus dulcis* y *salinus* son considerados virus gigantes, el primero se elimina al tiempo 5 y el segundo al tiempo 4. Los virus de la familia herpesviridae son el tercer grupo en abundancia (4%) con *Ictalurid herpesvirus 1*, *Abalone herpesvirus Victoria/AUS/2009*, *Human herpesvirus 3* y *Aotine herpesvirus 1*; todos ellos desaparecen al tiempo 4. Otro virus importante es el bracovirus de *Cotesia congregata* (2%), considerado un virus simbiótico, que presenta una relación estrecha con las avispas parásitas, también desaparece al tiempo 4 (Drezen et al, 2006). Se destaca la presencia del fago *phiA1122* de *Yersinia* (1 %), cuyos hospederos confirmados son *Yersinia pestis* y con menor frecuencia *Escherichia coli*, por lo que se considera un indicador importante de riesgo epidemiológico

(Garcia et al, 2003), este disminuye desde el ensilado tres, desaparece en el ensilado 4 y reaparece en el ensilado 5.

La diversidad del ensilado de 720 horas sugiere un proceso de descomposición. Esto se comprueba por el incremento en secuencias del fago G de *Bacillus megaterium* (de 14 en T1 a 344 en T5) una bacteria común en el medio ambiente (Vary et al, 2007). Otros virus que aparecen al final del proceso (720 horas) son: *Lactobacillus phage LP65*, *Erwinia phage vB EamM-Y2*, *Haloviruses*, cuyo hospedero principal son arqueas halófilas (Atanasova et al, 2015), *Erwinia phage phiEa21-4*, *Lactobacillus phage phij11*, *Camelpox virus*, *Acinetobacter phage Ac42*, *Lactococcus phage P335*, *Lactococcus phage bIL310*, *Lactobacillus phage Lb338-1*, *Lactococcus phage bIL311*, *Lactococcus phage bIL286*, *Lactococcus phage bIL312*, *Autographivirinae*, *Lactococcus phage BK5-T*, *Lactococcus phage bIL309*, *Enterobacteria phage phiEcoM-GJ1*, *Lactococcus phage ul36*, *Lactococcus phage bIL285*, *Synechococcus phage ACG-2014h*, *Lactococcus phage Tuc2009*, *Lactobacillus phage Lc-Nu* y *Pectobacterium phage PMI*. Si bien, nuevamente son preponderantes las BAL, el recambio en el tipo (de *Lactobacillus* a *Lactococcus*) y la aparición de generalistas, incluidos algunos patógenos como el *Camelpox* y fagos cuyos hospederos son responsables de la pudrición del material vegetal (*Erwinia*, *Chorella* y *Paramecium*), indican que la fermentación ya no es apta para el consumo por parte del ganado.

## 8.2 Diversidad beta

Existen diferencias significativas en la composición y abundancia de virus entre ensilados (Prueba de Friedman:  $\chi^2 = 645.24$ ,  $p = 1.78 \text{ E}^{-204}$ ), con la mayor divergencia entre el ensilado de 16 horas con relación al ensilado de 288 horas (T1 y T4 respectivamente), con un recambio de hasta el 90%. El valor de significancia fue corregido con el método de Bonferroni para determinar mejor el umbral de error (alfa corregida =  $1.05 \text{ E}^{-07}$ ). La composición viral del ensilado 2 (72 hrs) no difiere con relación al ensilado 5 (720 hrs) aún con un recambio del 62.76% de las especies (Figura 7 y Tabla 3).



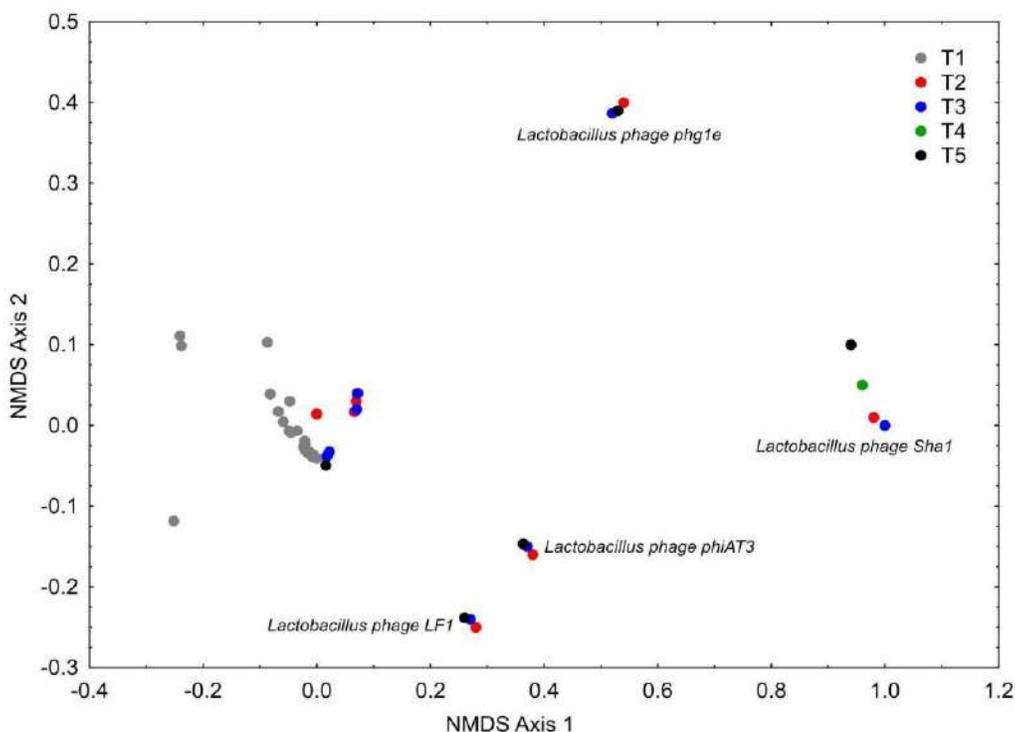
**Figura 7.** Análisis de diversidad  $\beta$ , con distancias de Jaccard. El cambio en la coloración representa el valor de recambio.

**Tabla 3.** Índice de similitud de Jaccard (bajo la diagonal) y valores de probabilidad significativos en rojo (sobre la diagonal), corregidos por el método de Bonferroni ( $\alpha = 1.05 E^{-07}$ ). Entre paréntesis se indica el porcentaje de recambio.

	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>	<b>T5</b>
<b>T1</b>		$1.07 E^{-56}$	$9.01 E^{-57}$	$7.16 E^{-65}$	$2.13 E^{-44}$
<b>T2</b>	0.463 (69.94%)		$4.98 E^{-10}$	$2.69 E^{-18}$	0.01372
<b>T3</b>	0.334 (77.42%)	0.544 (65.34%)		$7.33 E^{-09}$	$3.26 E^{-11}$
<b>T4</b>	0.134 (90.63%)	0.31 (76.33%)	0.321 (80.98%)		$9.09 E^{-32}$
<b>T5</b>	0.465 (70.11%)	0.545 (62.76%)	0.429 (76.56%)	0.342 (79.4%)	

Finalmente, el análisis NMDS mostró que la composición viral al inicio del ensilado correlaciona negativa y significativamente con ambos ejes de ordenamiento ( $R^2$  axis 1 = 0.94;

$R^2$  axis 2 = 0.8) y solo 4 especies, los fagos de *Lactobacillus Sha1*, *LF1*, *phiAT3* y *phg1e* se encuentran presentes a lo largo de todo el proceso, por lo que correlacionan positivamente con el eje 1. No obstante, para el ensilado de 288 h, prácticamente solo *Lactobacillus Sha1* se correlaciona con el eje 1. Este modelo es adecuado para explicar la variación en la composición viral pues tiene un Stress de 0.05 (Figura 7).



**Figura 8.** Análisis multimétrico no dimensional (NMDS) de la composición viral entre ensilados de *Agave salmiana*, con diferentes tiempos de fermentación.

## 9 DISCUSIÓN

Los ensilados convencionales se obtienen a partir de material vegetal troceado, restos de desbroce y desechos de legumbres, cuya humedad es alta y el contenido de fibra es bajo (Chavira, 2016). Esto facilita el manejo, reduce la concentración de metabolitos secundarios y llegan al ensilado con un proceso previo de descomposición que acelera la fermentación láctica. No obstante, el material utilizado en este trabajo estaba fresco, es rico en fibras y su contenido de metabolitos secundarios hace más difícil el tratamiento, por ello entender el

recambio a lo largo del tiempo es esencial para garantizar que este tipo de material sea inocuo para el ganado.

### 9.1 ENSILADO 1 (Tiempo 16 horas)

El ensilado de 16 horas contiene la mayor diversidad, con un total de 37 virus dominantes, entre los que encontramos virus bacteriofagos, fitopatógenos y zoonóticos, los cuales afectan la inocuidad y la seguridad alimentaria.

Pandoravirus es el género con mayor abundancia dentro de ensilado, perteneciente a la familia Pandoraviridae, contiene las especies *Pandoravirus dulcis* y *Pandoravirus salinus* considerados megavirus (DNA) su genoma supera el tamaño de algunas bacterias y arqueas (Yutin y Koonin, 2013). Estos virus difieren de los demás por el tamaño de su genoma (2.5 Mb) superando cualquier megavirus registrado hasta ahora. Ambos virus infectan *Acanthamoeba castellanii* (Sun et al, 2015) por lo que este protozooario patógeno es parte del microbioma al inicio del ensilado, su origen puede ser la contaminación de la muestra por excretas de aves y mamíferos. Por su presencia, la inocuidad del ensilado está comprometida, ya que es un virus nucleocitoplasmático, modificando el citoplasma de su huésped y reclutando mitocondrias para formar fábricas virales antes de la degradación completa del núcleo celular (Andrade et al, 2018). Las investigaciones sobre este virus se centran principalmente en su forma de aislamiento y caracterización biológica y taxonómica, no obstante, no se han reportado en presencia de ensilados vegetales, ni en fermentación lácticas.

Se identificaron especies de virus que parasitan invertebrados de diferentes géneros y familias, algunos con potencial para la fabricación de biopesticidas. El Bracovirus de *Cotesia congregata* parasita a larvas de la avispa *C. congregata* en cultivos de tabaco (Espagne et al, 2005). El iridovirus 22 de invertebrados fue aislado de una larva de mosca negra *Simulium* spp. (Piégu et al, 2014) que infectan principalmente invertebrados pero también se tiene registros en anfibios especialmente ranas sanas, las cuales se alimentaban de grillos, no obstante su patogenicidad sigue sin estar clara (Stöhr et al, 2016). Aunque se desconoce específicamente la capacidad de biocontrol del virus contenido en el ensilado, en trabajos previos se documentó la capacidad infecciosa de un iridovirus aislado de camaleón para causar mortalidad, entre el 20 y 35 % en grillos (Weinmann et al, 2007).

El virus iridiscente 6 de invertebrados puede inducir una respuesta inespecífica en mamíferos aunque es incapaz de ingresar en estos hospederos, esto hace al virus inofensivo ante el ganado ya que no se puede establecer una infección productiva (Ahlers et al, 2016). Tiene potencial en el control biológico contra algunas plagas de invertebrados, como en escarabajos *Phyllophaga vandinei* los cuales causan grandes daños en cultivos de caña de azúcar y árboles frutales. Se demostró que el virus incrementa significativamente la mortalidad tanto en hembras y machos, muriendo dos días después de ser infectados (Jenkins et al, 2011). Aunque infectan invertebrados (coleópteros y lepidópteros) de importancia médica y agrícola, no en todos los casos ocasionan infecciones letales en las poblaciones hospedadoras, sin embargo se puede mejorar su letalidad a través de un *Iridovirus* recombinante que posee una neurotoxina específica para insectos (Gencer et al, 2020). Al infectar la larva de los insectos con el virus se demostró una mortalidad del 100%, especialmente en las larvas de los lepidópteros de *Helicoverpa armigera*, *Lymantria dispar* y *Euproctis chrysorrhoea* y en larvas de coleópteros de *Tenebrio molitor* (Gencer et al, 2020). De cualquier forma, su uso como control biológico requiere más estudios.

El virus de la hipertrofia de las glándulas salivales de *Glossina pallidipes* infecta a *G. pallidipes* (mosca tse-tse) y *Musca domestica* (mosca doméstica) ocasionando la hipertrofia mencionada y la reducción de la fecundidad. La mosca tse-tse, es un vector de importancia de la tripanosomiasis humana africana (enfermedad del sueño) y la tripanosomiasis animal africana (nagana) en África subsahariana, perjudicando la salud humana y del ganado (Kariithi et al, 2012). Aunque la abundancia de este virus con potencial de biocontrol no supera el 1% de abundancia dentro del ensilado, es de interés biotecnológico y no se había reportado en otros ensilados.

El virus *Apoechima cinerarium nucleopolyhedrovirus* es un bioinsecticida, su acción radica en la enzima quitinasa capaz de degradar la quitina, ocasionando la licuefacción en insectos. Su efectividad es del 100% en larvas de *Bombyx mori* ocasionando perforaciones en la membrana peritrófica (Qinghua et al, 2015).

Dentro del ensilado se encuentran dos virus de la familia polydnavirus, son simbióticos transportados por avispas endoparásitos y transmitidos a los huéspedes en su forma de oruga durante la parasitación (Djoumad et al, 2013). El *Hyposoter fugitivus ichnovirus* se replica en los ovarios de algunas avispas endoparasitas como en *Hiposter*

*fugitivus* (D. Xu y Stoltz, 1993). Son necesarios para el desarrollo del huésped y se consideran simbioses virales. La expresión de los genes modifica la respuesta inmune del huésped y su desarrollo, favoreciendo el desarrollo del parasitoide (Dorémus et al, 2014). También se identificó virus *Glypta fumiferanae ichnovirus* simbiote de la avispa parasitoide *Glypta fumiferanae* (Stairs, 1983).

Sin embargo, en este ensilado también encontramos algunos virus de interés para la salud pública. Los virus de la familia herpesviridae son el tercer grupo en abundancia (4%) considerados virus patógenos capaces de provocar enfermedades significativas, especialmente en personas inmunodeprimidas, asociados con ciertos tipos de cánceres y pueden permanecer latentes después de la infección inicial (Korsantia et al, 2024). *Ictalurid herpesvirus 1* es el virus que se encuentra con mayor diversidad dentro del ensilado, afecta a los peces ciprínidos (Radosavljević et al, 2019). El *Abalone herpesvirus Victoria/AUS/2009* provoca ganglioneuritis viral del abulón, responsable de grandes pérdidas de este molusco marino criado en vida silvestre o acuicultura dentro de Australia y Asia (Corbeil et al, 2016).

*Cyprinid herpesvirus 3* miembro de la familia Alloherpesviridae, es una enfermedad letal y sumamente infecciosa entre la carpa común y los peces koi. Se propaga en todo el mundo, ocasionando pérdidas masivas en poblaciones silvestres y de cultivo, se ha detectado ADN viral en el hábitat durante el brote de la enfermedad, e inclusive 3 meses después del brote, pero el estudio se basó en la detección del genoma viral y no en la infectividad (Rakus et al, 2013). Se encuentra activo entre temperaturas de 15 a 28°C y puede subsistir en las células no infectadas a temperaturas no permisivas, además puede mantenerse durante largos periodos dentro del organismo volviéndose a activar cuando se regresa a temperatura aceptante (Dishon et al, 2007). Los peces pueden ser vacunados, no obstante, después de ser inmunizados pueden convertirse en portadores (Gotesman et al, 2013). *Cyprinid herpesvirus 1* relacionado estrechamente con el virus anterior, no obstante causan enfermedades diferentes (Waltzek et al, 2005). Afectan a los peces de la familia Cyprinidae ocasionado la viruela del pescado, que cuenta con registros desde 1563 y se propaga en todo el mundo de manera silvestre y en cautiverio. Provocando lesiones papilomatosas benignas en el epitelio de la carpa común, ocasionando grandes pérdidas dentro de la acuicultura (Radosavljević et al, 2019). Por lo tanto el ensilado, al menos en esta fase; debe contar con controles de manejo y calidad para evitar contagios en cultivos acuícolas. La presencia de todos estos herpesvirus

sugiere que el material vegetal se expuso en algún momento a heces de aves alimentadas con peces de cultivo.

El *Human herpesvirus 3* afecta solamente a células humanas, agente causal de varicela como del herpes zoster son potencialmente mortales. Ha sido reportada como un posible evento adverso después de la vacunación contra COVID-19. Es un virus presente en todo el mundo, depende de la edad pero es poco frecuente en infantes, oscila entre 1.2 y 3.4 por cada 1000, los más susceptibles son los pacientes geriátricos (>65 años) aunque afectando principalmente a inmunodeprimidos, presenta mayor tasa de mortalidad en mujeres que en hombres, si bien se puede prevenir por medio de la vacunación (Patil et al, 2022). No hay una fuente de contaminación clara, aunque es posible que las personas que realizaron la extracción del material vegetal lo hayan introducido y sean portadores.

*Aotine herpesvirus 1* fue aislado de las células de riñón de mono búho (Daniel et al, 1971). En Paraguay se identificó por primera vez un mono de la misma especie que presentaba un cuadro clínico letal, provocado por este virus, se mantenía en contacto con sus cuidadores pero no se menciona si tuvieron afecciones (Vetter et al, 2024). Aunque tiene un gran potencial como virus zoonótico en primates no humanos, aún no se cuentan con registros de casos en humanos. Dentro de este tiempo de fermentación, se presenta muy poca inocuidad, volviéndose peligroso para el consumo del ganado, además de que existen virus que solo se pudieron identificar hasta el orden Herpesvirales, los cuales abarcan virus que infectan una gran gama de animales, desde moluscos hasta humanos (Davison et al, 2008).

Por otra parte, el virus de *Phaeocystis globosa* parasita a la microalga marina que forma floraciones. Pertenece a la familia Phycodnaviridae, considerado un megavirus de doble cadena de ADN, esta familia se caracteriza por infectar algas marinas (Wilson et al, 2006). Este virus afecta la estructura quitinosa de *P. globosa* responsable de capturar grandes cantidades de carbono inorgánico, impidiendo la formación de estructuras en forma de estrella enriquecidas con carbono, aumentando el pastoreo por parte de herbívoros, el virus es responsable de una significativa mortalidad en sus poblaciones (Sheik et al, 2012). Nuevamente la fuente de contaminación pueden ser aves acuáticas.

### 9.2 ENSILADO 2 (Tiempo 72 horas)

En contraste con el ensilado 1 la concentración de riqueza y abundancia según el Índice de Shannon-Wiener decae gradualmente, de los 37 OTU's dominantes desaparecen los virus dsADN (ADN bicentenario) sin estadio de RNA, los cuales usualmente son virus que infectan arqueas (Prangishvili et al, 2016). Los bacteriofagos son los virus representativos dentro del ensilado 2, con dominancia por parte del Fago *LF1 de Lactobacillus*, seguido por los megavirus (*Pandodavirus dulcis* y *P. salinus*). Sin embargo, la cantidad de secuencias de virus sin clasificar aún son de importancia.

De igual manera, disminuyeron notoriamente los herpesviridae lo que indica una mejora en la inocuidad. Aunque aún se encuentra el *Human herpesvirus 3* que representa un riesgo de salud. También hay algunos virus con potencial en el control biológico contra invertebrados como *Invertebrate iridovirus 22*.

### 9.3 ENSILADO 3(Tiempo 164 horas)

En este punto, hay un recambio de bacteriófagos tipo lambda como *Lambdalikevirus* y *Enterobacteria phage lambda*. Estos virus requieren una presión osmótica positiva para la penetración de su material genético y algunos cationes polivalentes suprimen su capacidad de liberación del ADN de la cápside del fago (Evilevitch et al, 2003), esta supresión de actividad puede ser ocasionada por cambios en el pH durante la fermentación. De igual manera, estos bacteriófagos son sensibles a temperaturas elevadas que pueden causar inestabilidad o desnaturalización de sus proteínas (Campbell, 1961). De igual forma, en este ensilado se elimina *Apocheima cinerarium nucleopolyhedrovirus* que tiene potencial biotecnológico como control biológico contra larvas de *Bombyx mori* (Qinghua et al, 2015).

### 9.4 ENSILADO 4 (Tiempo 288 horas)

Al paso del tiempo el recambio aumenta y la diversidad disminuye favoreciendo la inocuidad, sobre todo en este ensilado donde solo se encuentran 12 especies de virus, de los cuales destacan los bacteriófagos con mayor concentración predominando el *Fago Sha 1 de Lactobacillus*.

Este ensilado contiene la mejor composición, ya que no se encuentra ningún virus zoonótico. No obstante, contiene virus sin clasificar, por lo que no se puede asegurar con

certeza su seguridad alimentaria. Actualmente, se han identificado alrededor de 32,000 virus patógenos para mamíferos, aunque las estimaciones calculan más de 3,000,000 desconocidos, con lo que el riesgo potencial es enorme (Siddell et al, 2023). La clasificación de los virus es una tarea compleja, debido a su abundancia en el planeta, es un grupo diverso debido a que están relacionados con procesos ecológicos y con hospederos de todos los dominios de la vida (Alarcón et al, 2018).

Esta limitación en la información respecto a la clasificación y funcionamiento de los virus enfatiza la importancia de estos virus no identificados en los ensilados. En nuestro caso, las secuencias no asignadas deben ser aisladas, secuenciadas en su totalidad y asignadas por un árbol filogenético a un grupo similar. Muchas veces se requiere también una caracterización por microscopía electrónica de barrido conjugado con su ligando para establecer afinidades y tropismos, finalmente también es necesario definir la estructura de su genoma (tipo de material genético, marcos de lectura, transcriptomas, etc.)(Siddell et al, 2023).

En la fermentación del ensilado T4, disminuye la diversidad de OTU's (Sáenz et al, 2023) mientras que dentro de este ensilado los *Lactobacillus* aumentaron su prevalencia, lo que indica que la comunidad de bacterias ácido lácticas (LAB) domina el microbioma del ensilaje de la pulpa de *Agave salmiana*. El incremento observado en fagos de *Lactobacillus*, está asociado con una mayor producción de ácido láctico en un tiempo de 10 a 12 días (Alcantar-Morales et al, 2024).

#### 9.5 ENSILADO 5 (Tiempo 720 horas)

En este tiempo existe un repunte en la abundancia y concentración de especies, los factores clave que afectan la calidad del ensilado compuesto de material vegetal, son la temperatura del ensilado, concentración del oxígeno y la manipulación del silo. Cuando se abre el silo o si existe algún fallo en la cubierta, el entorno hermético se perturba ocasionando que el entorno anaeróbico se invierta en aeróbico (Junga y Travnicek, 2015). El incremento de las secuencias del fago G el cual es un fago virulento de *Bacillus megateium* indican que ha iniciado el proceso de descomposición, ya que produce una enzima lítica que destruye la pared celular bacteriana, ocasionado que se liberen los fagos (Murphy, 1957).

En este punto el recambio del virus es mayor al 70%, mostrando un resurgimiento en la riqueza del viroma. Los fagos de *Erwinia*, *Chorella* y *Paramecium* son indicadores de un cambio funcional en la calidad del ensilado. Son modificados por factores físico-químicos dentro del ensilado, como en la sanidad, fuentes de carbono, relación carbono nitrógeno, aireación, exposición a la luz, densidad en la población y el total de moléculas de sólidos suspendidas (Khanjani et al, 2022). Aun así persiste la actividad de fermentación láctica, mediada por *Lactococcus sp* y *Lactobacillus*, esto es demostrado por la dominancia de los bacteriofagos *Shal* y *phigle* que persisten durante todo el ensilado.

## 9.6 BACTERIOFAGOS

Los fagos son los predominantes con el 59.6% del total de la biodiversidad evaluada, y entre ellos los más abundantes pertenecen al género *Lactobacillus*. En un estudio de la fermentación sobre repollo, zanahoria y nabos, los lactobacilos dominaban el microbioma. Las muestras contenían en su mayoría virus de dsADN con algunos virus ssADN y RNA eucariotas originados de materia prima, así como fagos infectantes de las familias Lactobacillaceae y Enterobacteriaceae (Gendre et al, 2025). Estos virus pueden alterar la ecología y evolución de las poblaciones en las comunidades a través de la lisis de bacterias, facilitar la transferencia horizontal de genes y alterar el metabolismo de carbono del hospedero (Puxty y Millard, 2022). Además, regulan la dinámica de fermentación relacionados con el ciclo de nutrientes en el ensilado (Wang et al, 2024). Los fagos de bacterias ácido lácticas (BAL) pertenecen al orden Caudovirales, con estructuras proteicas de inserción del material genético, constituido por dsADN (White et al, 2022). Incluyen a las familias Myoviridae, Siphoviridae y Podoviridae, que pueden infectar varios géneros bacterianos, incluidos *Lactobacillus* y *Pectobacterium* (anteriormente *Erwinia*), propios de los ensilados que evaluamos (Villion, 2009).

Algunos estudios de ensilados anteriores, mostraron que los principales fagos pertenecen a los Caudovirales y Geplafuvirales, que infectan principalmente a Campylobacterales y Enterobacterales. Debido a su rango de hospederos más amplio, los fagos virulentos y no patógenos dominan. Estos virus comparten un gen de pirofosfokinasa de ribosa-fosfato (*prsA*), lo que sugiere un papel en la regulación del metabolismo del carbono durante el ensilado (Wang et.al, 2024).

El reemplazo de *Lactobacillus* a *Lactococcus*, se ha reportado anteriormente en ensilados, demostrando una gran tolerancia a la acidez por parte tanto de hospederos como de los virus (Ohmomo et al, 2002). En nuestros resultados también ocurre el mismo reemplazo al final del proceso (*Caudovirales* a *Skunavirus*) y varios factores determinaron las poblaciones de BAL en los silos, como las propiedades de los materiales vegetales. Este cambio puede deberse al bajo pH inicial de la pulpa de agave, que contribuye a la selección de bacterias tolerantes a la acidez (Álvarez et al. 2015).

Los fagos que se encuentran durante todo el ensilado pertenecen a la familia Siphoridae, los cuales infectan a *Lactobacillus* spp, estos fagos pueden ser del tipo temperados (sin actividad infecciosa) o virulentos, los que dominan el ensilado son del primer tipo. Estos virus no presentan una amenaza para las BAL, ya que tienen la capacidad de integrarse en el ADN del huésped, permaneciendo en un estado latente hasta que existan condiciones que activen el estado lítico (White et al, 2022).

La metagenómica viral (fagoómica) ha demostrado la prevalencia, abundancia y el papel de los fagos durante la fermentación. Existen estudios realizados en Kimchi, donde indican que las comunidades virales tienen una asociación con los orígenes geográficos que las comunidades bacterianas. Aunque existen lagunas dentro de estas investigaciones, por la existencia de virus que no se alinean con ningún virus anteriormente clasificado. Existen pocos estudios sobre métodos de extracción específicos para fagos en comparación con las extracciones estándar de metagenomas, limitando su funcionamiento dentro del microbioma (White et al, 2022).

Podemos concluir que aún no existen los suficientes estudios para entender la interacción completa de los fagos en el microbioma. Sin embargo, se resalta que los fagos tienen una gran aplicación biotecnológica, especialmente en el biocontrol dentro de los ensilados pues la interacción fago-BAL reduce la eficiencia del ensilado llevando a un deterioro aeróbico del proceso, de igual manera la riqueza del microbioma dentro del ensilado genera una variación importante en la calidad del proceso, ya sea a favor o en contra de la eficiencia (Ohmomo et al, 2002). En cuanto a la inocuidad, durante el proceso, es notorio que la contaminación inicial del material genera una amplia diversidad y potencial patógeno, pero el propio proceso de fermentación elimina gradualmente estos riesgos generando un alimento propicio para el ganado a las 288 horas.

## 10 CONCLUSIONES

El uso del *Agave salmiana* como materia prima para realizar ensilados, demostró ser una alternativa plausible de los ensilados convencionales, debido a su inocuidad alimentaria y su aceptable calidad en la fermentación. Su interacción en el microbioma, demuestra que al pasar del tiempo su diversidad disminuye, el tiempo de fermentación de 288 horas es el que demuestra una mejor composición, ya que únicamente encontramos virus bacteriófagos de *Lactobacillus*, sin ningún virus zoonótico o de importancia médica. La fermentación láctica persiste en todas las muestras, mediada por las bacterias ácido lácticas, ya que los fagos prevalecen durante todos los tiempos de fermentaciones. Después de las 720 horas la calidad del ensilado disminuye, por el repunte en la diversidad de virus no pertenecientes al tipo bacteriófagos. En todas las muestras, podemos encontrar virus con potencial biotecnológico, por ejemplo para control biológico contra invertebrados; no obstante, también se encuentran virus que afectan a la acuicultura esto puede deberse a la contaminación cruzada. Este estudio tomó relevancia como la primera aproximación dirigida exclusivamente para el viroma, aunque aún existen lagunas debido a la falta de registros, duplicaciones en las muestras y por la contaminación cruzada en la materia prima.

## 11 REFERENCIAS

- Adriaenssens, E. M., Sullivan, M. B., Knezevic, P., van Zyl, L. J., Sakar, B. L., Dutilh, B. E., Afenas-Zerbini, P., Tonocka, M., Tong, Y., Rodney, B. J., Moreno, S. A. I., Klimpp, J., Karam, A. R., Barylski, J., Uchiyama, J., Edwards, R. A., Kropinski, A. M., Petty, N. K., Clokie, M. R. J., Kushkina, A. I., Morozova, V. V., Duffy, S., Gillis, A., Rumnieks, J., Kurtböke, I., Chanishvili, N., Goodridge, L., Wittmann, J., Lavigne, R., Bin, J. H., Prangishvili, D., Enault, F., Turner, D., Poranen, M. M., Oksanen, H. M. y Krupovic, M. (2020). Taxonomy of prokaryotic viruses: 2018-2019 update from the ICTV Bacterial and Archaeal Viruses Subcommittee. *Archives of Virology*, 165, 1253–1260. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04577-8>.
- Ackermann, H. W. (2009). Phage classification and characterization. En: Clokie, M. R., y Kropinski, A. M. (eds) *Bacteriophages. Methods in Molecular Biology*. Vol 501. Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_13).

- Alarcón, D., y Ojeda, R. (2018). Virus: pequeños gigantes que dominan el planeta. *Comunicaciones Libres*, 69(2).
- Ahlers, L. R. H., Bastos, R. G., Hiroyasu, A., y Goodman, A. G. (2016). Invertebrate Iridescent Virus 6, a ADN Virus, Stimulates a Mammalian Innate Immune Response through RIG-I-Like Receptors. *PLoS ONE*, 11(11), e0166088. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166088>.
- Alcalá, B. R. I., Batuman, O., Brawner, J., Cuellar, W. J., Delaquis, E., Etherton, B. A., French-Monar, R. D., Kreuze, J. F., Navarrete, I., Ogero, K., Plex Sulá, A. I., Yilmaz, S., y Garrett, K. A. (2023). Translating virome analyses to support biosecurity, on-farm management, and crop breeding. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1056603. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1056603>.
- Alcantar-Morales, S. L., Ramírez-Ortiz, A., Gallardo-Martínez, D., Favela-Torres, E., Cruz-Guerrero, A. E., y Viniegra-González, G. (2024). Kinetics and microbiology of pulp silage from decorticated *Agave salmiana* leaves. *Mexican Journal of Biotechnology*, 9(4), 14-29. <https://doi.org/10.29267/mxjb.2024.9.4.14>.
- Atanasova, N. S., Oksanen, H. M., y Bamford, D. H. (2015). Haloviruses of archea, bacteria, and eukaryotes. *Current Opinion of Microbiology*, 25, 40-48. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.04.001>.
- Álvarez-Fuentes, G., García-López, J. C. y Pinos-Rodríguez, J. M. (2015) Maguey (*Agave* spp.) silage production with either alfalfa or mesquite pod meal as protein sources. *Journal of Animal & Plant Science*, 24(1), 3714-3721.
- Andrade, A. C. D. S. P., De Miranda Boratto, P. V., Rodrigues, R. A. L., Bastos, T. M., Azevedo, B. L., Dornas, F. P., Oliveira, D. B., Drumond, B. P., Kroon, E. G., y Abrahão, J. S. (2018). New Isolates of Pandoraviruses: Contribution to the Study of Replication Cycle Steps. *Journal of Virology*, 93(5). <https://doi.org/10.1128/jvi.01942-18>.
- Blanco-Picazo, P., Gómez-Gómez, C., Tormo, M., Ramos-Barbero, M. D., Rodríguez-Rubio, L., y Muniesa, M. (2022). Prevalence of bacterial genes in the phage fraction of food viromes. *Food Research International*, 156, 111342. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111342>

- Blas-Yañez, S., y Thomé-Ortiz, H. (2021). Agave pulquero (*Agave salmiana*), socio-economic and agro-ecological importance and its development perspectives: a literature review. *Ciência Rural*, 51(4). <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20200441>
- Brown, J. B. (1880). *Ensilage of green crops* (1.<sup>a</sup> ed.) [Library\_of\_congress; biodiversity; fedlink]. The Library of Congress. <https://archive.org/details/ensilageofgreenc00goff/page/n7/mode/2up>.
- Cadwell, K. (2017). The virome in host health and disease. *Immunity*, 42(5), 805-813.
- Campbell, A. (1961). Sensitive mutants of bacteriophage  $\lambda$ . *Virology*, 14(1), 22-32. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(61\)90128-3](https://doi.org/10.1016/0042-6822(61)90128-3).
- Claudio, W. K. (1988). El ensilaje como proceso de conservación de forraje. *Serie Remehue (Chile)*. no. 3.
- Chavira, J. S. (2016). Potential Use of Nonconventional Silages in Ruminant Feeding for Tropical and Subtropical Areas. En *InTech eBooks*. <https://doi.org/10.5772/64382>
- Chen, Y., Chen, Y., Shi, C., Huang, Z., Zhang, Y., Li, S., Li, Y., Ye, J., Yu, C., Li, Z., Zhang, X., Wang, J., Yang, H., Fang, L., y Chen, Q. (2018). SOAPnuke: a MapReduce acceleration-supported software for integrated quality control and preprocessing of high-throughput sequencing data. *GigaScience*, 7(1), 1-6. <https://doi.org/10.1093/gigascience/gix120>
- Coleman-Derr, D., Desgarenes, D., Fonseca-Garcia, C., Gross, S., Clingenpeel, S., Woyke, T., North, G., Visel, A., Partida-Martinez, L., y Tringe, S. G. (2015). Plant compartment and biogeography affect microbiome composition in cultivated and native *Agave* species. *New Phytologist*, 209(2), 798-811. <https://doi.org/10.1111/nph.13697>.
- Corbeil, S., Williams, L., McColl, K., y Crane, M. (2016). Australian abalone (*Haliotis laevis*, *H. rubra* and *H. conicopora*) are susceptible to infection by multiple abalone herpesvirus genotypes. *Diseases of Aquatic Organisms*, 119(2), 101-106. <https://doi.org/10.3354/dao02989>.
- Cusato, S., Gameiro, A. H., Corassin, C. H., Anderson, A. A., Cruz, A. G., Faria, J. A. F., y de Oliveira, A. F. (2013). Food safety in a small dairy factory: Implementation, major

- challenges, and assessment of systems' performances. *Foodborne, Pathogens, and Disease*, 10(1), 6-12. <https://doi.org/10.1089/fpd.2012.1286>
- da Cunha, D. T. (2021). Improving food safety practices in food service industry. *Current Opinion in Food Science*, 42, 127-133. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.05.010>
- Da Poian, A. T., Oliveira, A. C., Gaspar, L. P., Silva, J. L., y Weber, G. (1993). Reversible pressure dissociation of R17 bacteriophage. The physical individuality of virus particles. *Journal of Molecular Biology*, 231(4), 999-1008. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1993.1347>.
- Daniel, M. D., Melendez, L. V., King, N. W., Fraser, C. E. O., Barahona, H. H., Hunt, R. D., y Garcia, F. G. (1971). Herpes Virus Aotus: A Latent Herpesvirus from Owl Monkeys (*Aotus trivirgatus*) Isolation and Characterization. *Experimental Biology and Medicine*, 138(3), 835-845. <https://doi.org/10.3181/00379727-138-36002>.
- Davison, A. J., Eberle, R., Ehlers, B., Hayward, G. S., McGeoch, D. J., Minson, A. C., Pellett, P. E., Roizman, B., Studdert, M. J., y Thiry, E. (2008). The order Herpesvirales. *Archives of Virology*, 154(1), 171-177. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0278-4>.
- Du, Z., Yamasaki, S., Oya, T., Ngulube, D., Euridse, D., Tinga, B., Macome, F., y Cai, Y. (2023). Microbial network and fermentation modulation of Napier grass and sugarcane top silage in southern Africa. *Microbiology Spectrum*, 12(1), e03032-23. <https://doi.org/10.1128/spectrum.03032-23>.
- Dishon, A., Davidovich, M., Ilouze, M., y Kotler, M. (2007). Persistence of Cyprinid Herpesvirus 3 in Infected Cultured Carp Cells. *Journal of Virology*, 81(9), 4828-4836. <https://doi.org/10.1128/jvi.02188-06>.
- Djoumad, A., Stoltz, D., Béliveau, C., Boyle, B., Kuhn, L., y Cusson, M. (2013). Ultrastructural and genomic characterization of a second banchine polydnavirus confirms the existence of shared features within this ichnovirus lineage. *Journal of General Virology*, 94(8), 1888-1895. <https://doi.org/10.1099/vir.0.052506-0>.
- Dorémus, T., Cousserans, F., Gyapay, G., Jouan, V., Milano, P., Wajnberg, E., Darboux, I., Cònsoli, F. L., y Volkoff, A. (2014). Extensive Transcription Analysis of the *Hyposoter didymator* Ichnovirus Genome in Permissive and Non-Permissive Lepidopteran Host Species. *PLoS ONE*, 9(8), e104072. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104072>.

- Drezen, J.-M., Bézier, A., Lesobre, J., Huguet, E., Cattolico, L., Periquet, G., y Dupuy, C. (2006). The few virus-like genes of *Cotesia congregata* bracovirus. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 61(3), 110–122. doi:10.1002/arch.20108.
- Evilevitch, A., Lavelle, L., Knobler, C. M., Raspaud, E., y Gelbart, W. M. (2003). Osmotic pressure inhibition of ADN ejection from phage. *Proceedings of The National Academy of Sciences*, 100(16), 9292-9295. <https://doi.org/10.1073/pnas.1233721100>.
- Espagne, E., Douris, V., Lalmanach, G., Provost, B., Cattolico, L., Lesobre, J., Kurata, S., Iatrou, K., Drezen, J., y Huguet, E. (2005). A Virus Essential for Insect Host-Parasite Interactions Encodes Cystatins. *Journal of Virology*, 79(15), 9765-9776. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.15.9765-9776.2005>.
- Figueredo-Urbina, C. J., Álvarez-Ríos, G. D., García-Montes, M. A., y Octavio-Aguilar, P. (2021). Morphological and genetic diversity of traditional varieties of agave in Hidalgo State, Mexico. *Research Square (Research Square)*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-143808/v1>.
- García-Montes, M. A., Figueredo-Urbina, C. J., y Octavio-Aguilar, P. (2024) Systematic review for understanding Mexican biodiversity: The Agaves of Hidalgo. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 30(1), 1-20. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2023.06.030>
- Garay-Martínez, J. R., Lucio-Ruiz, F., Godina-Rodríguez, J. E., Joaquín-Cancino, S., Maldonado-Jáquez, J., y Granados-Rivera, L. D. (2024). Valor nutritivo de ensilados de soya y pasto buffel en diferentes proporciones. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 15(2), e3648. <https://doi.org/10.29312/remexca.v15i2.3648>.
- Gencer, D., YesiLyurt, A., Güllü, M., DemiR, İ., y Nalcacioglu, R. (2020). Insecticidal activities of wild type and recombinant invertebrate iridescent viruses on five common pests. *Turkish Journal of Entomology*, 365-373. <https://doi.org/10.16970/entoted.700189>.
- Gendre, J. C., Marrec, C. L., Chaillou, S., Omhover-Fougy, L., Landaud, S., y Dugat-Bony, E. (2025). Exploring viral diversity in fermented vegetables through viral metagenomics. *Food Microbiology*, 128, 104733. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2025.104733>.

- Gotesman, M., Kattlun, J., Bergmann, S., y El-Matbouli, M. (2013). CyHV-3: the third cyprinid herpesvirus. *Diseases of Aquatic Organisms*, 105(2), 163-174. <https://doi.org/10.3354/dao02614>.
- Hammer, O., Harper, D. A. T., y Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Paleontologia Electronica*, 4(1), 9.
- Jenkins, D., Hunter, W., y Goenaga, R. (2011). Effects of Invertebrate Iridescent Virus 6 in *Phyllophaga vandinei* and its Potential as a Biocontrol Delivery System. *Journal of Insect Science*, 11(44), 1-10. <https://doi.org/10.1673/031.011.0144>.
- Jianu, C., y Golet, I. (2014). Knowledge of food safety and hygiene and personal hygiene practices among meat handlers operating in western Romania. *Food Control*, 42, 214-219. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.02.032>.
- Jiménez, E. S. (2025). El Maguey Mexiquense: Patrimonio Biocultural y Sustentabilidad en el aprovechamiento de una Planta Ancestral y Bien Común. *Revista Veritas de Difusão Científica.*, 5(3), 1982-2011. <https://doi.org/10.61616/rvdc.v5i3.327>
- Junga, P., y Travnicek, P. (2015). Surface temperature of the exposed silo face as quick indicator of the decomposition process of maize silage. *Journal of Central European Agriculture*, 16(1), 76-91. <https://doi.org/10.5513/jcea01/16.1.1544>.
- Kariithi, H., Ahmadi, M., Parker, A., Franz, G., Ros, V., Haq, I., Elashry, A., Vlak, J., Bergoin, M., Vreysen, M., y Abd-Alla, A. (2012). Prevalence and genetic variation of salivary gland hypertrophy virus in wild populations of the tsetse fly *Glossina pallidipes* from southern and eastern Africa. *Journal of Invertebrate Pathology*, 112, S123-S132. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.04.016>.
- Khanjani, M. H., Mohammadi, A., y Emerenciano, M. G. C. (2022). Microorganisms in biofloc aquaculture system. *Aquaculture Reports*, 26, 101300. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101300>.
- Koonin, E. V., Krupovic, M., y Agol, V. (2021). The Baltimore classification of viruses 50 years later: How does it stand in the light of virus evolution? *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 85(3), 0005321. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00053-21>.
- Korsantia, N., Katsitadze, A., Tsiskarishvili, N., Adamashvili, N., Goginashvili, T., Bibichadze, M., Korsantia, N., y Katsitadze, T. (2024). Family Herpesviridae – an

- overview. *Experimental & Clinical Medicine Georgia*, 1, 21-34. <https://doi.org/10.52340/jecm.2024.01.04>.
- Koskella, B., y Brockhurst, M. A. (2014). Bacteria–phage coevolution as a driver of ecological and evolutionary processes in microbial communities. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(5), 916-931. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12072>.
- Lever, M. A., Torti, A., Eickenbusch, P., Michaud, A. B., Antl-Temkiv, T. Å., y JÃ Rrgensen, B. B. (2015). A modular method for the extraction of DNA and RNA, and the separation of DNA pools from diverse environmental sample types. *Frontiers In Microbiology*, 6, 146856. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00476>.
- Lewis, R., Clooney, A. G., Stockdale, S. R., Buttimer, C., Draper, L. A., Ross, R. P., y Hill, C. (2020). Isolation of a Novel Jumbo Bacteriophage Effective Against *Klebsiella aerogenes*. *Frontiers in Medicine*, 7, 510170. <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.00067>.
- Licona, A. S., Ramírez, J. M. R., & Cigarroa, E. V. (2024). Manejo y preservación cultural del maguey en San Mateo Tlajomulco, Hidalgo. *Textual*, 83. <https://doi.org/10.5154/r.textual/2023.83.06>.
- Ma, Y. (2019). Wild plant species associated viromes: towards improved characterization strategies and variability in various ecological environments. Doctoral dissertation, Université de Bordeaux. Consultado 30 de noviembre de 2024 en: <https://theses.hal.science/tel-02426251/>
- Mahony, J., y Van Sinderen, D. (2022). Virome studies of food production systems: time for ‘farm to fork’ analyses. *Current Opinion In Biotechnology*, 73, 22-27. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.06.014>.
- Mahony, J., y Van Sinderen, D. (2014). Current taxonomy of phages infecting lactic acid bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 5, 77426. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00007>.
- Martínez-Puchol, S., Rusiñol, M., Fernández-Cassi, X., Timoneda, N., Itarte, M., Andrés, C., Antón, A., Abril, J. F., Girones, R., y Bofill-Mas, S. (2020). Characterization of the sewage virome: Comparison of NGS tools and occurrence of significant pathogens. *Science of the Total Environment*, 713, 136604. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136604>

- McIntosh R. P. (1981). Succession and ecological theory. In: D.C. West, H.H. Shugart, and D.B. Botkin, editors. *Forest succession: concepts and application*. Springer–Verlag, New York, New York, USA, pp. 10–23. [https://doi.org/10.1007/978-1-4612-5950-3\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4612-5950-3_3).
- Moreno, C. E. (2001). Métodos para medir la biodiversidad. M&T–Manuales y Tesis SEA, vol. 1. *Zaragoza*, 84, (922495), 2.
- Murphy, J. S. (1957). A phage-associated enzyme of *Bacillus megaterium* which destroys the bacterial cell wall. *Virology*, 4(3), 563-581. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(57\)90086-7](https://doi.org/10.1016/0042-6822(57)90086-7).
- Narváez Suárez, A. U., Martínez Saldaña, T., y Jiménez Velázquez, M. A. (2016). El cultivo de maguey pulquero: opción para el desarrollo de comunidades rurales del altiplano mexicano. *Revista de Geografía Agrícola*, (56), 33-44.
- Navarrete, N. D. (2020). Bacteriófagos. *Revista de la Facultad de Medicina Humana*, 20(1), 164-165. <https://doi.org/10.25176/rfmh.v20i1.2554>
- NCBI Resource Coordinators (2016). Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research*, 44(D1,4), D7-D19. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1290>
- Ohmomo, S., Tanaka, O., Kitamoto, H. K., y Cai, Y. (2002). Silage and microbial performance, old story but new problems. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 36(2): 59-71. <https://doi.org/10.6090/jarq.36.59>
- Pasolli, E., Asnicar, F., Manara, S., Zolfo, M., Karcher, N., Armanini, F., Beghini, F., Manghi, P., Tett, A., Ghensi, P., Collado, M. M., Rice, B. L., DuLing, C., Morgan, X. C., Golden, C. D., Quince, C., Huttenhower, C., y Segata, N. (2019). Extensive unexplored human microbiome diversity revealed by over 150,000 genomes from metagenomes spanning age, geography, and lifestyle. *Cell*, 176(3), 649-662.e20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.001>.
- Patil, A., Goldust, M., y Wollina, U. (2022). Herpes zoster: A Review of Clinical Manifestations and Management. *Viruses*, 14(2), 192. <https://doi.org/10.3390/v14020192>.

- Pavon, N. P., y Meza, S. M. (2009). Cambio climático en el estado de Hidalgo, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca de Soto, Hidalgo, México. ISBN: 978-607-482-096-6.
- Pérez-Luna, E. J., Albores, M. S., Ruiz, G. A., Espinosa, V. S., Alayón, G. A., y Ruíz, S. B. (2024). Fermentación y digestibilidad ruminal in vitro de ensilados de Sorghum bicolor y Cajanus cajan. *Abanico Veterinario*, 15, 1-20. <http://dx.doi.org/10.21929/abavet2024.2>.
- Peña-Rodríguez, A., Pelletier-Morreeuw, Z., García-Luján, J., Rodríguez-Jaramillo, M. del C., Guzmán-Villanueva, L., Escobedo-Fregoso, C., Tovar-Ramírez, D., y Reyes, G. (2020). Evaluation of *Agave lechuguilla* by-product crude extract as a feed additive for juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research*, 51(4), 1336-1345. <https://doi.org/10.1111/are.14497>.
- Phelan, P., Moloney, A. P., McGeough, E. J., Humphreys, J., Bertilsson, J., O’Riordan, E. G., y O’Kiely, P. (2014). Orange legumes for grazing and conserving in ruminant production systems. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34 (1-3), 281-326. <https://doi.org/10.1080/07352689.2014.898455>.
- Pich, U., y Schibert, I. (1993). Pich, U., & Schubert, I. (1993). Midiprep method for isolation of ADN from plants with a high content of polyphenolics. *Nucleic acids research*, 21 14, 3328. <https://doi.org/10.1093/NAR/21.14.3328>
- Piégu, B., Guizard, S., Yeping, T., Cruaud, C., Couloux, A., Bideshi, D. K., Federici, B. A., y Bigot, Y. (2014). Complete genome sequence of invertebrate iridovirus IIV22A, a variant of IIV22, isolated originally from a blackfly larva. *Standards in Genomic Sciences*, 9(3), 940-947. <https://doi.org/10.4056/sigs.5059132>.
- Pinos-Rodríguez, J. M., Aguirre-Rivera, J. R., García-López, J. C., Rivera-Miranda, M. T., González-Muñoz, S., López-Aguirre, S., y Chávez-Villalobos, D. (2006). Use of “Maguey” (*Agave salmiana* Otto ex. Salm-Dick) as Forage for Ewes. *Journal of Applied Animal Research*, 30(2), 101-107. <https://doi.org/10.1080/09712119.2006.9706596>.
- Pinos-Rodríguez, J., Zamudio, M., y González, S. (2008). The effect of plant age on the chemical composition of fresh and ensiled *Agave salmiana* leaves. *South African Journal of Animal Science*, 38(1). <https://doi.org/10.4314/sajas.v38i1.4108>.

- Poma, H. R., Davies, C., Gutiérrez, C. D., Mora, M. C., Basombrío, M. A., y Rajal, V. B. (2012). Comparison of nucleic acid extraction efficiency using different commercial kits and qPCR. Effect of inhibitors. *Review of Argentine Microbiology*, 44(3), 144-199.
- Puxty, R. J., y Millard, A. D. (2022). Functional ecology of bacteriophages in the environment. *Current Opinion In Microbiology*, 71, 102245. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2022.102245>.
- Prangishvili, D., Basta, T., Garrett, R. A., y Krupovic, M. (2016). Viruses of the Archaea. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1-9. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000774.pub3>,
- Qinghua, W., Yuzhu, W., Guoli, Z., y Yongan, Z. (2015). Identification of a chitinase from *Apocheima cinerarius* nucleopolyhedrovirus. *African Journal of Microbiology Research*, 9(23), 1536-1542. <https://doi.org/10.5897/ajmr2015.7538>.
- Quintanilha-Peixoto, G., Fonseca, P. L. C., Raya, F. T., Marone, M. P., Bortolini, D. E., Mieczkowski, P., Olmo, R. P., Carazzolle, M. F., Voigt, C. A., Soares, A. C. F., Pereira, G. A. G., Góes-Neto, A., y Aguiar, E. R. G. R. (2021). The sisal virome: uncovering the viral diversity of agave varieties reveals new and organ-specific viruses. *Microorganisms*, 9(8), 1704. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081704>.
- Radosavljević, V., Maksimović-Zorić, J., Veljović, L., Ljubojević, D., Ćirković, M., Marković, Z., y Milićević, V. (2019). Cyprinid herpesvirus diseases. *Archives of Veterinary Medicine*, 10(1), 51-60. <https://doi.org/10.46784/e-avm.v10i1.81>
- Ramírez-Restrepo, C. A., y Barry, T. N. (2005). Alternative temperate forages containing secondary compounds for improving sustainable productivity in grazing ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 120(2-4), 179-201. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.01.015>.
- Rakus, K., Ouyang, P., Boutier, M., Ronsmans, M., Reschner, A., Vancsok, C., Jazowiecka-Rakus, J., y Vanderplasschen, A. (2013). Cyprinid herpesvirus 3: an interesting virus for applied and fundamental research. *Veterinary Research*, 44(1). <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-85>.

- Ruiz-Juárez, D., Del Carmen García-Contreras, A., Azaola-Espinosa, A., Preciado-Rangel, P., y Gutiérrez-Rojas, M. (2025). Riesgos microbiológicos en maíz nativo para uso forrajero (*Zea mays*) cultivado con biol de cerdo. *Revista Mvz Córdoba*, 30(1), e3523. <https://doi.org/10.21897/rmvz.3523>.
- Sadurski, J., Polak-Berecka, M., Staniszewski, A., y Wasko, A. (2024). Step-by-step metagenomics for food microbiome analysis: A detailed review. *Foods*, 13(14), 2216. <https://doi.org/10.3390/foods13142216>
- Sáenz, J. S., Rios-Galicia, B., Rehkugler, B., y Seifert, J. (2023). Dynamic development of viral and bacterial diversity during grass silage preservation. *Viruses*, 15(4), 951. <https://doi.org/10.3390/v15040951>
- Sánchez-Rojas, G., y Bravo-Cadena, J. (2017). Medio físico del estado de Hidalgo. En: Ramírez-Bautista, A., Sánchez-González, A., Sánchez-Rojas, G., Cuevas-Cardona, C. (eds). Biodiversidad del estado de Hidalgo. Tomo I, capítulo 3. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Pachuca, Hidalgo, México. ISBN: 978-607-482-501-5. <https://doi.org/10.29057/books.32>.
- Samarfard, S., McTaggart, A. R., Sharman, M., Bejerman, N. E., y Dietzgen, R. G. (2020). Viromes of ten alfalfa plants in Australia reveal diverse known viruses and a novel RNA virus. *Pathogens*, 9(3), 214. <https://doi.org/10.3390/pathogens9030214>.
- Stairs, G. R. (1983). Oviposition by *Glypta fumiferanae* (Hymenoptera: Ichneumonidae) in *Chroristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae) larvae and the effect of honey in their fecundity and survival. *The Canadian Entomologist*, 115(6), 689-692. <https://doi.org/10.4039/ent115689-6>.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (1999). *NOM-061-ZOO-1999: Especificaciones zoosanitarias de los productos alimenticios para consumo animal*. Diario Oficial de la Federación.
- SENASICA (2024). Sistemas de Inocuidad SRRC (Sistemas de Reducción de Riesgos de Contaminación). Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Consultado el 2 de diciembre de 2024 en: <https://www.gob.mx/senasica/articulos/una-definicion-clara-de-inocuidad-70674?idiom=es>

- Sheik, A. R., Brussaard, C. P. D., Lavik, G., Foster, R. A., Musat, N., Adam, B., y Kuypers, M. M. M. (2012). Viral infection of *Phaeocystis globosa* impedes release of chitinous star-like structures: quantification using single cell approaches. *Environmental Microbiology*, 15(5), 1441-1451. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02838.x>.
- Siddell, S. G., Smith, D., Adriaenssens, E., Alfenas-Zerbini, P., Dutillh, B. E., García, M. L., Junglen, S., Krupovic, M., Kuhn, J. H., Lambert, A. J., Lefkowitz, E. J., Łobocka, M., Mushegian, A. R., Oksanen, H. O., Robertson, D. L., Rubino, L., Sabanadzovic, S., Simmonds, P., Suzuki, N., Van Doorslaer, K., Vandamme, A. M., Varsani, A., y Zerbini, F. M. (2023). Taxonomía de virus y el papel del Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV). *Journal of General Virology*, 104(5), 001840. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001840>
- Sun, C., Feschotte, C., Wu, Z., y Mueller, R. L. (2015). ADN transposons have colonized the genome of the giant virus *Pandoravirus salinus*. *BMC Biology*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s12915-015-0145-1>.
- Stöhr, A. C., Papp, T., y Marschang, R. E. (2016). Repeated detection of an invertebrate iridovirus in amphibians. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, 26(1-2), 54. <https://doi.org/10.5818/1529-9651-26.1-2.54>.
- Torre-Almaraz, R., Vargas, D., Segura-Salazar, M., Pallas, V., y Sánchez-Navarro, A. (2023). *Agave attenuata* and *Agave amica*, new hosts of tuberose mild mosaic virus in Mexico. *Plant Disease*, 107(10), 2907-3327. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-23-0549-PDN>
- Torre-Almaraz, R., Segura-Salazar, M., y Zavala-Padilla, G. T. (2024). Cytological effect of viral infection associated with yellow streak symptoms on *Agave tequilana*. *Journal of Microbiology and Modern Techniques*, 8(1), 102.
- Vary, P. S., Biedendieck, R., Fuerch, T., Meinhardt, F., Rohdo, M., Deckwer, W. D., y Jahn, D. (2007). *Bacillus megaterium*– from simple soil bacterium to industrial protein production host. *Applied Microbiological Biotechnology*, 76(5), 957-967. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1089-3>
- Wang, Y., Gao, Y., Lin, Y., Xu, G., Yang, F., y Ni, K. (2024). Insights into the phage community structure and potential function in silage fermentation. *Journal of*

<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2024.120837>.

- Waltzek, T. B., Kelley, G. O., Stone, D. M., Way, K., Hanson, L., Fukuda, H., Hirono, I., Aoki, T., Davison, A. J., y Hedrick, R. P. (2005). Koi herpesvirus represents a third cyprinid herpesvirus (CyHV-3) in the family Herpesviridae. *Journal of General Virology*, 86(6), 1659-1667. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80982-0>.
- Wasserman, L. (2004). All of Statistics: A concise course in statistical inference. *Springer Text in Statistics*. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-21736-9>
- Weinmann, N., Papp, T., De Matos, A. P. A., Teifke, J. P., y Marschang, R. E. (2007). Experimental infection of crickets (*Gryllus bimaculatus*) with an invertebrate iridovirus isolated from a high-casqued chameleon (*Chamaeleo hoehnelii*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 19(6), 674-679. <https://doi.org/10.1177/104063870701900609>.
- Wilkinson, J. M., Bolsen, K. K., y Lin, C. J. (2015). History of Silage. En: Agronomy monograph/Agronomy (pp. 1-30). <https://doi.org/10.2134/agronmonogr42.c1>.
- Wilson, W. H., Schroeder, D. C., Ho, J., y Canty, M. (2006). Phylogenetic analysis of PgV-102P, a new virus from the English Channel that infects *Phaeocystis globosa*. *Journal of The Marine Biological Association of The United Kingdom*, 86(3), 485-490. <https://doi.org/10.1017/s0025315406013385>.
- White, K., Yu, J., Eraclio, G., Bello, F. D., Nauta, A., Mahony, J., y Van Sinderen, D. (2022). Bacteriophage-host interactions as a platform to establish the role of phages in modulating the microbial composition of fermented foods. *Microbiome Research Reports*, 1:3. <https://doi.org/10.20517/mrr.2021.04>.
- Yutin, N., y Koonin, E. V. (2013). Pandoraviruses are highly derived phycodnaviruses. *Biology Direct*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/1745-6150-8-25>.
- Xia, X., y Yuen, K. Y (2005). Differential selection and mutation between dsADN and ssADN phages shape the evolution of their genomic AT percentage. *BMC Genetics*, 6: 20. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-6-20>.
- Xu, D., y Stoltz, D. (1993). Polydnavirus genome segment families in the ichneumonid parasitoid *Hyposoter fugitivus*. *Journal of Virology*, 67(3), 1340-1349. <https://doi.org/10.1128/jvi.67.3.1340-1349.1993>.

- Vetter, J. R., Florentín-Morel, M., Riera-Domínguez, M., y Cañiza, R. G. (2024b). Lethal infection by *Herpes simplex* virus 1 (HSV-1) in a captive Azara's Owl Monkey (*Aotus azarae*) in Paraguay. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 38(3). <https://doi.org/10.17533/udea.rccp.v38n3a5>.
- Villion, M. (2009). Bacteriophages of *Lactobacillus*. *Frontiers In Bioscience*, 14, 1661. <https://doi.org/10.2741/3332>.
- Zárate, R., Taboada, B., Yocupicio-Monroy, M., y Arias, C. F. (2017). Human virome. *Archives of Medical Research*, 48(8), 701-716. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2018.01.005>