



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Xochimilco

**ANÁLISIS METAGENÓMICO DE LA MICROBIOTA  
INTESTINAL EN MONOS AULLADORES NEGROS  
(*Alouatta pigra*)**

Tesis que para obtener el grado de Doctora en Ciencias Agropecuarias

PRESENTA:

**DOLORES HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ**

Directores de tesis

Dr. Alejandro A. Azaola Espinoza

Dr. Juan Carlos Serio Silva

Asesora:

Dra. Eria A. Rebollar Caudillo

CDMX, 2020



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Xochimilco

**ANÁLISIS METAGENÓMICO DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN MONOS  
AULLADORES NEGROS**

*(Alouatta pigra)*

La presente tesis fue realizada bajo la supervisión del Comité Tutorial indicado a continuación y aprobada como requisito en el plan de estudios para obtener el grado de : **DOCTORA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**COMITÉ TUTORAL**

---

**Director: Dr. Alejandro Alberto Azaola Espinosa**

---

**Co-Director: Dr. Juan Carlos Serio Silva**

---

**Asesora: Dra. Eria Alaide Rebollar Caudillo**

CDMX, agosto 2020

## DEDICATORIA

*A Antonio Acini, me devolviste la vida...todo y más*

*A Paula y Luziana, los motores que me impulsan.*

*“Yo mantengo que “gracias” es la más alta forma del pensamiento;  
y que la gratitud es la felicidad duplicada por la admiración”*

*– G.K. Chesterton*

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-México) le agradezco el apoyo financiero recibido durante el doctorado (No. 278987).

Agradezco a mis directores de tesis. Doctor Alex Azaola por su excelente calidad humana, su apoyo incondicional y por creer siempre en mí. Doctor Juan Carlos, por brindarme un espacio y muchas experiencias.

A mi Asesora Dra. Eria Rebollar, gracias por todo tu apoyo, por tus enseñanzas y por ser siempre la primera en responder.

Al Dr. Germán Mendoza, por su infinito apoyo y por estar siempre al pendiente de todos sus estudiantes.

Al Dr. Luis García Feria, por las asesorías improvisadas, por sus consejos y sobre todo por su amistad.

A Rodolfo Martínez “Fito”, por su apoyo, las asesorías exprés y su “buena onda” justo cuando más lo necesitaba.

Al Doctor Ornelas, por adoptarme en su laboratorio y apoyarnos siempre. Para usted toda mi admiración y respeto.

A todos los “vertebrados y los evolutivos” por los gratos momentos de convivencia.

A los Doctores y compañeros del Laboratorio de Biotecnología de la UAM-X, Raquel, Lino, Dr. Esteban, Dra. Paty, ¡a todos!

A mis papás, Ma y Pa gracias por estar ahí cuando más los necesitamos.

A mi hermana, Chinis, gracias por ser esa “bocanada de aire fresco”, por tu apoyo, tus consejos, por alentarme a seguir y por siempre hacerme reír.

A mis niñas Paula y Luziana, gracias por su paciencia y por la motivación para seguir adelante.

A Antón, mi compañero, amigo, maestro, consejero y mi fan #1, ¡a ti, gracias por todo!

## ÍNDICE

RESUMEN.....	6
ABSTRACT .....	7
I. INTRODUCCIÓN .....	8
II. ANTECEDENTES .....	10
A) <i>Alouatta pigra</i> : Características biológicas, anatómicas y fisiológicas.....	10
B) Interacción con otras especies.....	11
C) Estudio de la microbiota intestinal.....	14
D) Microbiota intestinal en primates.....	15
E) Técnicas de caracterización del microbioma .....	17
F) Importancia de las bifidobacterias. ....	18
III. OBJETIVOS.....	31
A) Objetivo General.....	31
B) Objetivos Específicos .....	31
IV. PRODUCTOS ACADÉMICOS.....	32
A) <i>Molecular detection of Bifidobacterium spp. in faeces of black howler monkeys (Alouatta pigra). Hernández-Rodríguez D, Vásquez-Aguilar A.A, Serio-Silva J.C., Rebollar E.A., Azaola-Espinosa, A. 2019. JOURNAL OF MEDICAL PRIMATOLOGY. 48: 99-105 https://doi.org/10.1111/jmp.12395.</i> .....	32
B) «Éramos muchos y parió la mona»: dieta de ' <i>Alouatta pigra</i> ' en condiciones de fragmentación en Balancán, Tabasco. Hernández Rodríguez, D., Serio Silva, J.C. (2020). KUXULKAB', 26(54): 27-39, enero-abril. DOI: https://doi.org/10.19136/kuxulkab.a26n54.3208.....	40
C) <i>Seasonal and habitat effects on the gut microbiota composition of black howler monkeys (Alouatta pigra) in fragmented rainforest. Hernández-Rodríguez D, Rebollar E.A.; Serio-Silva J.C and Azaola-Espinosa A.</i> .....	54

<i>D) Interacción de monos aulladores negros (Alouatta pigra) y fauna ganadera que cohabitan en una región del sureste mexicano. Implicaciones en la estructura del microbioma.</i> .....	85
V. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES: LA MICROBIOTA INTESTINAL DE LOS AULLADORES, CANTANDO DESDE SU INTERIOR.....	101
ANEXO .....	110

## RESUMEN

La microbiota intestinal realiza importantes funciones metabólicas para la salud del hospedero, como la activación del sistema inmunitario y la degradación de los componentes de la dieta para obtener energía y nutrientes. Estas funciones impactan en el estado nutricional y la salud del individuo, sin embargo, dependen de la composición y proporción de especies microbianas, de las interacciones entre la microbiota y su hospedero, así como de los componentes de su dieta. Actualmente, los métodos de secuenciación masiva han permitido el desarrollo de estudios metagenómicos sobre la microbiota intestinal; para los monos aulladores negros (*A. pigra*) esto significa una mejor comprensión de los procesos que son relevantes para su estilo de vida natural, así como las implicaciones del cautiverio. A través de muestras de heces frescas de individuos que viven en un remanente de bosque altamente perturbado con actividad antropogénica (RSV), un remanente preservado (SVUC) e individuos en cautiverio (BCLR y YMK), se realizó la identificación de especies de *Bifidobacterium* no descritas previamente en poblaciones de monos aulladores silvestres, así como una descripción y comparación de la microbiota intestinal en los distintos hábitats de vida libre y cautiverio, y el efecto por los cambios en el paisaje a través de tres estaciones (secas, lluvias y nortes), además de las implicaciones de la cohabitación con fauna ganadera. También se realizó una descripción de la dieta por especie y recurso consumido (hojas, flores y frutos) a través de las tres temporadas antes mencionadas. En conclusión, se reporta la presencia de *B. longum* en heces de monos aulladores negros en México. El análisis de los perfiles taxonómicos de la microbiota intestinal demostró cambios entre los grupos de vida libre y cautiverio estudiados siendo estos cambios más evidentes en los *phyla* Bacteroidetes y Firmicutes. Se considera a la dieta como un factor determinante para la conformación del microbioma de los monos aulladores, siendo evidentes los cambios en la conformación del microbioma entre los individuos de cautiverio y vida libre, así como las variaciones entre las tres temporadas estudiadas. No se apreciaron grandes diferencias en la selección de alimentos por los monos aulladores entre los dos sitios, a pesar de presentar características diferentes entre ellos. La selección de alimentos se relacionó con la disponibilidad de estos en cada temporada, pero la dieta siempre fue mayormente folívora.

## ABSTRACT

Intestinal microbiota in vertebrates plays important metabolic functions, such as the immune system stimulation and degradation of certain dietary components to obtain energy. These functions have a great impact on the nutritional status and health organisms; however, they depend on the proportion of microbial species and their interactions with the host and the components of their diet. Currently, mass sequencing methods have allowed the development of metagenomics to study gut microbiomes; for black howler monkeys (*A. pigra*) it implies a better understanding of the relevant processes to their natural lifestyle, as well as the implications of captivity. Through the collection of fresh stool samples from *A. pigra* individuals living in a remnant of highly disturbed forest with anthropogenic activity (RSV), a preserved remnant (SVUC) and individuals in captivity (BCLR and YMK), we identified for the first time the presence of *Bifidobacterium* in populations of wild howler monkey. We also characterized the gut microbiome of *A. pigra* populations from different habitats and between captive and wild individuals, as well as the effect of changes in landscape through three seasons (dry, rainy and nortes) and the implications of cohabitation with livestock fauna. The diet description by species and element consumed (leaves, flowers, or fruits) was conducted through the three seasons mentioned above. In conclusion, the presence of *B. longum* in feces of black howler monkeys in Mexico is reported. The examination of taxonomic profiles at phyla level showed changes between the wild and captive groups studied being more evident in Bacteroidetes and Firmicutes.

Diet is considered as a determining factor for the microbiome conformation of the howler monkeys. The changes found in the microbiome conformation among the captive and wild howler monkeys, as well as the variations between the three seasons studied, were evident.

No major differences in food selection were observed between the two sites of wildlife, despite presenting different characteristics between them. The food selection was related to the availability of these in each season, although the diet was always mostly folivore.



## I. INTRODUCCIÓN

Diversos estudios han señalado que los vertebrados mantienen una estrecha relación simbiótica con los microorganismos que albergan y que han coevolucionado con ellos. Incluso se cree que esos microorganismos pueden influir en los procesos de adaptación y evolución de sus hospederos (Shapira, 2016).

Estas comunidades microbianas denominados microbiota, que en conjunto con el genoma y sus funciones conforman el microbioma, se encuentran en su mayoría en el tracto digestivo y su recuento celular supera considerablemente a las células de los propios hospederos (Ley *et al.* 2008; Balter, 2012, Mueller and Sachs 2015).

La microbiota intestinal (MI), lleva a cabo importantes funciones metabólicas como la degradación de los componentes de la dieta para la obtención de energía y nutrientes, tanto para los propios microorganismos como para el hospedero, con un destacado papel en la síntesis de vitaminas y ayudando en la absorción de diversos minerales como calcio, fósforo, magnesio y hierro (Ehrlich, *et al.*, 2011).

También son capaces de afectar la estructura y fisiología del intestino, aumentando la superficie de absorción y promoviendo la renovación de las células de las vellosidades; así mismo se ha detectado que algunas bacterias del microbioma degradan compuestos tóxicos y propician la eliminación de sustancias carcinogénicas y/o mutagénicas (Harzallah and Belhadj, 2013).

Las funciones del microbioma no sólo derivan de su acción directa sobre los componentes de la dieta, sino también de su capacidad para inducir genes del hospedero implicados en el metabolismo de nutrientes; estas funciones tienen una gran repercusión en el estado nutritivo y de salud del individuo, no obstante, dependen de la composición y proporción de las especies microbianas así como de sus complejas interacciones con los componentes de la dieta y con el hospedero (Ehrlich, *et al.*, 2011; Haro, *et al.*, 2004).

La conformación microbiana intestinal del hospedero depende de factores diversos como la dieta, la genética y las influencias del ambiente al que se expone desde su nacimiento hasta que finalmente se establece con amplia dominancia de bacterias benéficas que superan a las oportunistas que son más sensibles a los cambios intrínsecos de la mucosa intestinal y a las transiciones de la dieta (Palmer *et al.* 2007).

Para las poblaciones de primates silvestres los cambios en la dieta a través de las diferentes temporadas del año son comunes; algunos estudios experimentales suponen que estos cambios en la dieta del hospedero en diferentes temporadas impactan la composición la MI. Sin embargo, es importante aclarar la relación entre hábitat, dieta y microbioma para poder entender cómo interactúan estos factores entre sí y de qué manera afectan al hospedero (Amato *et al.* 2015).

Aunque algunos investigadores señalan que el genoma del hospedero puede ser un factor modulador de la composición de la MI (Toivanen *et al.* 2001; Zoetendal *et al.* 2004), estudios realizados con monos aulladores en vida libre, sugieren que es más probable que los patrones asociados a la composición del microbioma se deban a efectos ambientales como el hábitat y la dieta (Amato *et al.* 2013).

Las interacciones con otras especies no nativas, por ejemplo en el caso de fauna doméstica y ganadera, también pueden influir en los componentes del microbioma al crearse una red de conexiones dinámicas que permite el intercambio de microorganismos en todas las direcciones, pues además de aumentar la probabilidad de emergencia de nuevos patógenos (Rhyan and Spraker, 2007), la microbiota local puede beneficiarse de las contribuciones aditivas e intercambios con la diversidad de bacterias del ambiente externo que le pueden facilitar la adaptación local a un nicho cambiante (Shapira, 2016).

En las especies folívoras, incluyendo los primates del género *Alouatta*, se ha resaltado la importancia de las bacterias fermentadoras, quienes juegan un papel crucial en los procesos de degradación y fermentación de los alimentos, convirtiendo las paredes celulares de la planta en ácidos grasos volátiles, metano y dióxido de carbono mediante funciones probióticas que permiten hacer uso eficaz del material vegetal, asegurando el óptimo funcionamiento del sistema gastrointestinal y ejerciendo efectos benéficos en el hospedero (Nidasio-de la Cerda, 2002).

Sin embargo, algunos estudios han mostrado que esto sólo ocurre en condiciones de vida libre y/o cuando la dieta no se ve alterada, pues ante cambios drásticos de la dieta, como ocurre en cautiverio y en hábitats perturbados, se observa una disminución en la diversidad bacteriana (Amato *et al.*, 2013; 2015; Pastor-Nieto, 2015), que puede llevar a estados de disbiosis, que en términos generales, se define como cualquier cambio en la composición de las comunidades

comensales residentes en relación con la comunidad que se encuentra en individuos sanos (Petersen and Round, 2014)

## II. ANTECEDENTES

### A) *Alouatta pigra*: Características biológicas, anatómicas y fisiológicas

El mono aullador negro (*Alouatta pigra*), también conocido como saraguato es una de las tres especies de primates silvestres que se distribuyen en el sureste de México; es un primate arbóreo y de hábitos diurnos; su longitud promedio es de 70 cm de largo sin incluir la cola, que es ligeramente más larga que el cuerpo; una de sus características principales es que poseen un hueso hioides muy desarrollado con una modificación que les permite emitir su aullido característico (Nagy and Milton, 1976).

En condiciones naturales los monos aulladores negros ocupan ámbitos hogareños de entre 10 a 60 hectáreas y suelen vivir en tropas de 3 a 11 individuos; aunque dadas las condiciones de pérdida de hábitat a las que se enfrentan actualmente, los monos aulladores se han tenido que adaptar a vivir en áreas más pequeñas y aun así ser capaces de aprovechar de manera eficiente los recursos alimenticios disponibles. (Chapman, 1990; Arroyo-Rodríguez *et al.*, 2006; Pozo-Montuy and Serio-Silva, 2006).

*A. pigra* es considerada una especie de importancia ecológica por su destacado papel en la dinámica de los bosques tropicales participando como dispersores de semillas (Serio-Silva and Rico-Gray, 2002) y fungiendo como organismos centinelas o indicadores del estado de los ecosistemas (Pérez Gil *et al.*, 1996).

Actualmente esta especie está catalogada en peligro de extinción según la norma oficial mexicana (NOM-059-SEMARNAT-2010) y la IUCN (Marsh, *et al.*, 2008), siendo la pérdida y fragmentación de su hábitat importantes factores que han contribuido a su disminución poblacional (Estrada and Coates-Estrada, 1996). Aunado a lo anterior, al ser una especie carismática y relativamente dócil, han resultado una presa atractiva para su captura y tráfico ilegal, llegando a ser la segunda especie de primate más comercializada en México. (Duarte-Quiroga and Estrada, 2003; González-Espinoza, *et al.* 2005; Améndola, 2009; Gual-Sill and Rendón-Franco, 2011).

Generalmente, los monos comercializados, terminan siendo decomisados o abandonados y, en algunas ocasiones, son incorporados a sitios de resguardo, sin embargo, bajo condiciones de cautiverio la mortalidad suele ser elevada (Gual-Sill and Rendón-Franco 2011; Pastor-Nieto, 2015). Un análisis de la mortalidad de monos araña y monos aulladores en cautiverio mostró que entre 67.6% y 82.3% de las muertes fueron causadas por trastornos gastrointestinales y que 34.3% de esas muertes ocurrieron durante el primer mes de cautiverio (Gual-Sill and Rendón-Franco 2011).

Bajo estas circunstancias de degradación de su hábitat natural y en cautiverio, el bienestar de los individuos depende en gran medida de que la dieta reúna los nutrientes necesarios y de que las condiciones anatómicas y fisiológicas favorezcan su adecuada asimilación (Haro, *et al.*, 2004; Pastor-Nieto, 2015).

En los monos aulladores (*Alouatta spp.*) el sistema digestivo es pequeño y especializado, el tracto digestivo tiene gran cantidad de adaptaciones, el intestino es elongado y además poseen un ciego grande en donde tiene lugar la fermentación bacteriana de los alimentos (Milton, 1980; Mayor and López, 2012). El colon es otro lugar potencial de fermentación, aunque proporcionalmente más pequeño en comparación al de otros primates. Se ha identificado que esta sección del aparato digestivo es sumamente especializada y en conjunto con un espacioso ciego, representan una adaptación necesaria para la digestión de una dieta basada principalmente en hojas (Ullrey, 1986; Hume, 2002).

Otra adaptación es la presencia de microorganismos simbióticos que conforman la mayor parte de la MI de los monos y que mantienen una estrecha y permanente interacción de gran complejidad que puede contribuir de manera significativa al equilibrio salud- enfermedad a través de funciones metabólicas, inmunitarias y conductuales (Giglio *et al.* 2013).

Una de las funciones clave de la MI es facilitar la digestión de la fibra vegetal, principalmente celulosa y hemicelulosa, usando enzimas de las que el animal hospedero carece (Amato, *et al.* 2015).

### *B) Interacción con otras especies*

En las últimas décadas el aumento de los asentamientos humanos y sus demandas alimentarias ha generado importantes cambios en el uso del suelo ya sea para vivienda o para la producción agrícola

y ganadera para satisfacer la demanda de proteína animal (Daszak *et al.* 2000); estos hechos tienen consecuencias negativas sobre el ambiente como la fragmentación o la pérdida de los hábitats naturales o el aumento de la contaminación ambiental (Daszak *et al.* 2001; Smith *et al.* 2009).

Uno de los aspectos que se ha considerado en los últimos años es la interacción entre humanos, ganado doméstico, fauna silvestre y el ambiente que les rodea. Esta interacción, denominada *interfaz humanos-animales domésticos-fauna silvestre*, da origen a una red de conexiones dinámicas que favorece el intercambio multidireccional de microorganismos (Rhyan and Spraker, 2007).

Anteriormente las enfermedades en fauna silvestre se consideraban relevantes sólo si representaban amenazas para la ganadería o salud pública (Daszak *et al.* 2000). Incluso se solía responsabilizar a los animales silvestres de ser la fuente de patógenos para humanos y ganado doméstico (Fischer and Gerhold, 2002); sin embargo, pese a lo que se había manejado comúnmente, la transmisión de microorganismos entre animales domésticos y silvestres suele ser multidireccional (Bengis *et al.* 2002), y en algunos casos, los efectos sobre la fauna silvestre son desconocidos.

Actualmente son muchos los ejemplos de introducción de microorganismos del ganado a los animales silvestres, aunque todos estos estudios se centran en la transmisión de patógenos, por ejemplo, *Mycobacterium bovis*, causante de la tuberculosis bovina (Palmer *et al.* 2012), *Sarcoptes scabiei*, que causa sarna sarcóptica (Smith *et al.* 2009), *Parvoviridae* que provocan la infección por el parvovirus canino tipo 1 (Daszak *et al.* 2000) o la *Moraxella bovis* causante de queratoconjuntivitis infecciosa (Giacometti *et al.* 2000).

Otros estudios han demostrado que las enterobacterias como *E. coli* y *Salmonella* presentan asociaciones genéticas (epidemiológicas), es decir, que pueden adaptarse para ser transmitidas entre especies de hospederos silvestres y domésticos que comparten el mismo hábitat; en los trabajos descritos por Kagambega *et al.* (2013), se observa una asociación entre enterobacterias provenientes de ganado bovino y erizos africanos que comparten el mismo hábitat, lo que infiere una relación en la transmisión entre estas dos especies debido al traslape y fragmentación del hábitat por la ganadería.

Una investigación reciente muestra la prevalencia de parásitos del género *Hepatozoon*, un parásito emergente que afecta a los animales domésticos que cohabitan con fauna silvestre en zonas fragmentadas; se encontraron prevalencias en los mamíferos de 9,7%, siendo perros la especie con mayor prevalencia con 63,3%; sus análisis filogenéticos revelaron que las secuencias genéticas estaban más cerca de la secuencia de *H. canis* de origen doméstico, que de las de origen silvestre (Jarquín-Díaz *et al.* 2016).

Del mismo modo, cada vez hay más evidencias de transmisión de patógenos de los humanos a animales, lo que se conoce como zooantroponosis (Messenger *et al.* 2014). Un ejemplo es el trabajo descrito por Rwego *et al.* (2008), donde se observa la misma asociación epidemiológica entre gorilas, ganado bovino, ganado ovino y humanos que comparten el mismo hábitat.

Goldberg *et al.* (2008), reportan resultados similares entre humanos, ganado caprino (*Capra aegagrus hircus*), colobos rojos (*Ptilocolobus kirkii*), colobos blancos y colobos negros (*Colobus guereza*), y cercopitecos de cola roja (*Cercopithecus ascanius*), habiendo mayor relación de bacterias en las zonas fragmentadas por la ganadería que en las zonas conservadas. Asimismo, se ha reportado la asociación entre bacterias presentes en humanos, animales de granja y la fauna silvestre que habita a su alrededor (Allen *et al.*, 2011), lo que sugiere la importancia de la fragmentación en las interacciones entre los distintos hospederos que comparten un hábitat en la dinámica de transmisión de distintas enfermedades o agentes patógenos.

No obstante, la transmisión o intercambio de bacterias entre especies y el ambiente que les rodea, no solo se refleja en efectos adversos, pues se puede dar origen a asociaciones bacterianas de formas variables y brindar a las bacterias comensales cierta flexibilidad adaptativa (Shapira, 2016).

Habría entonces que considerar si este sesgo hacia los animales silvestres puede provocar acciones con potencial efecto perjudicial sobre los esfuerzos de conservación.

Es por eso que, el estudio de la transmisión y flujo de microorganismos resulta clave para conocer cómo la interfaz humanos- animales domésticos- fauna silvestre influye sobre su dinámica y establecimiento en el hospedero (Brook and McLachlan, 2006).

### *C) Estudio de la microbiota intestinal*

El estudio de la microbiota se inició a principios de los 1900, principalmente con Metchnikoff (1908) y sus tratados sobre la “flora intestinal” y desde entonces han sido muchos los trabajos que se han enfocado a conocer las características y las funciones de esos microorganismos en los humanos.

La primera especie bacteriana recuperada del tracto intestinal fue *Escherichia coli*, aislada por Theodore von Escherich en 1885 a partir de heces de niños que presentaban enfermedad diarreica (Shulman, *et al.* 2007). La descripción de la población microbiana gastrointestinal continuó en los años siguientes y dio lugar a la caracterización completa de más de 400 especies cultivadas (Rajilic-Stojanovic, 2007).

En la década de los 90s inicia el auge de las investigaciones del microbioma basadas en herramientas moleculares. Uno de estos estudios pioneros utilizó la PCR para amplificar secuencias específicas del gen 16S rRNA para 12 bacterias anaerobias que predominan en el tracto intestinal humano y fue utilizado para la detección cuantitativa de estas especies (Wang, Cao and Cernigia, 1996).

En 1998 se describió por primera vez la diversidad bacteriana intestinal basado en secuencias del gen 16S rRNA (Zoetendal *et al.* 1998). Sin embargo, el primer estudio amplio con miras a la caracterización de la comunidad microbiana del intestino humano basado en el análisis de la secuencia del gen 16S rRNA, fue publicado en 1999 (Suau *et al.* 1999).

Recientemente, gracias a los avances en las tecnologías de secuenciación y la bioinformática, se han desarrollado diversos proyectos a gran escala han llevado a cabo la tarea de descifrar la estructura y las funciones de la MI humana así como sus relaciones con la salud y la enfermedad; uno de los proyectos pioneros es el Proyecto Meta HIT (Metagenomics of the Human Intestinal Tract), ha estudiado la microbiota intestinal en 700 individuos abordando su implicación en trastornos metabólicos (obesidad, diabetes tipo 2) y en inflamación intestinal (Qin *et al.* 2010). Otro proyecto denominado Human Microbiome Project, ha estudiado la microbiota de la boca, fosas nasales, piel, tracto genital e intestino de 300 individuos definidos como sanos en distintas regiones geográficas (Aagaard *et al.* 2012).

Los resultados obtenidos en estos proyectos, así como el conocimiento cada vez más amplio de la importancia del estudio de los ecosistemas y la integración de múltiples disciplinas ha resaltado la importancia del estudio del microbioma en otras especies animales. Inicialmente, el

conocimiento de las funciones de la MI de mamíferos se concentró principalmente en animales en cautiverio, criados en laboratorio o animales domésticos asociados a la producción pecuaria (Brambilla and De Filippis, 2005).

Hoy en día, el estudio de la MI y del microbioma en conjunto, ha tomado una importante relevancia para los profesionales del estudio de la vida silvestre, incluidos los primatólogos, quienes han incorporado estos estudios para comprender mejor a sus sujetos de estudio.

A partir de esto, podemos ver que cada vez son más las investigaciones que involucran a la fauna en diversas disciplinas como el comportamiento (Archie y Theis, 2011), la evolución (Fraune y Bosch, 2010) y la conservación (Stumpf *et al.*, 2016; West *et al.*, 2019).

Además de que también las especies de fauna silvestre estudiadas son cada vez más variadas, incluyendo elefantes (Finch, 2013), peces (Wong and Rawls, 2012), aves (Uchii *et al.* 2006), termitas (Breznak and Pankratz, 1997) y primates (Amato, *et al.*, 2013; Greene *et al.*, 2019).

#### *D) Microbiota intestinal en primates*

Es posible encontrar documentos que involucran el estudio de la, entonces llamada, “flora intestinal” que datan de la primera década de los 1900’s y que incluyen primates no humanos como sujetos de estudio (Herter and Kendall, 1910). Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, los estudios eran basados en cultivos bacterianos, con todas las limitaciones que esto implica y los primates sólo eran usados como modelos de estudio.

Para la década de los 90, se publicaron diversos trabajos que estudian la MBI de primates como modelos humanos. Otro estudio utilizó herramientas moleculares para identificar y cuantificar doce especies de bacterias predominantes en los intestinos de diversas especies de animales domésticos y de experimentación, incluyendo primates (*Macaca mulatta*), aquí se menciona la utilidad de las técnicas moleculares (Wang, Cao and Cerniglia, 1996).

También se han realizado investigaciones, empleando primates como modelos en estudios dirigidos a humanos, en los que se hacen asociaciones entre la alteración de la MBI y diversas condiciones de salud/enfermedad como la endometriosis (Bailey and Coe, 2002), estrés prenatal y riesgo de infecciones posparto (Bailey, Lubach and Coe, 2004), colitis crónica e infecciones por lentivirus (McKenna *et al.*, 2008) y diversas infecciones oportunistas tanto bacterianas como virales, (Sasseville and Diters, 2008).



Es a partir de la segunda década de los 2000's cuando la microbiota de primates se empieza a considerar como un factor importante para el estudio de su propia especie, incluyéndose aspectos de evolución (Ochman *et al.*, 2010; Stupmf *et al.*, 2016) y conducta social (Moeller *et al.*, 2016).

La caracterización del microbioma en diversas especies de primates también tomó relevancia en esta época. Uno de estos estudios analizó la MI de chimpancés, encontrando una importante presencia de bacterias consideradas benéficas (*Clostridium leptum*, *Lactobacillus gasseri* and *Bifidobacterium pseudocatenulatum* o *B. catenulatum*), así como otros grupos bacterianos que son comúnmente encontradas en humanos sanos (Uenishi, *et al.*, 2015).

En primates Strepsirrhini que incluye a las especies (*Microcebus rufus*, *Varecia variegata*, *Lemur catta*, *Propithecus coquereli*, *Avahi laniger*, *Indri indri*, *Propithecus candidus*, *Eulemur rubriventer*, *Eulemur macaco*, entre otros), se ha mostrado evidencia de la relación entre en las estrategias de alimentación, la edad y la MI. Así mismo se ha encontrado que la estructura de la MI refleja la filogenia del hospedador, es decir, hospederos más estrechamente relacionados, comparten una composición más parecida de MI (McKeney, Rodrigo and Yoder, 2015; Aivelo, Laakkonen and Jernvalla, 2016; Greene *et al.*, 2019).

En monos aulladores negros (*Alouatta pigra*) el primer estudio de microbiota hizo una evaluación de las bacterias hidrogenotróficas que mantienen el equilibrio intestinal del hidrógeno para reducir el dióxido de carbono a metano, siendo éste el primer estudio que dio indicios sobre la composición microbiana del colon de monos aulladores silvestres y cautivos, y en el cual se muestra la importancia de estas bacterias en los procesos de fermentación de los alimentos (Nakamura *et al.* 2011).

En 2013, Amato *et al.* describieron el impacto del hábitat en la microbiota de monos aulladores negros del sureste de México encontrando que la riqueza y diversidad de especies microbianas difiere notablemente entre los grupos de monos que ocupan diferentes hábitat; sus resultados revelan una mayor riqueza de grupos bacterianos en los grupos que habitaban bosque continuo, siendo seis veces mayor que en los monos en cautiverio y hasta dos veces mayor que en los que ocupaban hábitat fragmentados. La importancia de este estudio es el conocimiento de que una alteración de la riqueza y diversidad de la MI puede generar estados de disbiosis, afectando la salud de los monos, estos datos también revelan el riesgo de estos primates tras el cambio de dieta causado por la degradación del hábitat o por el cautiverio.

En un estudio más reciente se plantea el papel de la MI para compensar las variaciones de la dieta; derivado de una evaluación de la conducta de forrajeo y los patrones de actividad del mono aullador, se observaron pocos cambios en la actividad de los monos, a pesar de que la composición de la dieta, energía y nutrientes consumidos varió durante las temporadas muestreadas, lo que puede indicar que la microbiota contribuye a equilibrar la ingesta de nutrientes bajo las condiciones de cambios en la disponibilidad de alimentos y la dieta. (Amato *et al.*, 2015).

Con base en estos estudios resulta importante enfatizar el papel de las bacterias benéficas en el establecimiento de la MI y sus posibles repercusiones en la salud del organismo hospedero.

### *E) Técnicas de caracterización del microbioma*

Antes del desarrollo de las técnicas de secuenciación masiva, el estudio de la composición bacteriana se basaba en el cultivo y aislamiento de bacterias (métodos cultivo dependientes), pero bajo estas condiciones sólo se obtenía una visión limitada de la diversidad de especies en la MI. Además de que el desconocimiento de los requerimientos nutricionales de determinados subgrupos de bacterias y por ende la dificultad de cultivarlos, imposibilita en gran manera su identificación y caracterización taxonómica (Frank and Pace 2008).

Los nuevos métodos de secuenciación masiva de material genético y el desarrollo de estudios metagenómicos, permiten el estudio directo de todo el material genético contenido en las muestras que se obtienen de un determinado nicho ecológico (método cultivo independiente). El metagenoma se describe como el conjunto de todos los microorganismos y su contenido genético que se encuentran presentes en una comunidad ecológica (Escalante, *et al.* 2014; Frank and Pace 2008).

Actualmente la aproximación más común en estudios bacterianos consiste en la extracción del DNA, seguida de la amplificación y secuenciación de los genes que codifican la subunidad 16S del RNA ribosomal conocido como método de amplicones del 16S. Este gen es común a todas las bacterias y contiene regiones conservadas y regiones variables por lo que las diferencias en la secuencia de nucleótidos del gen 16S permiten la caracterización taxonómica de las bacterias que componen una comunidad (Handelsman *et al.* 1998).

A partir del análisis de amplicones de 16S, se puede caracterizar el perfil taxonómico en las muestras a estudiar con secuencias de referencia en bases de datos (Cole, *et al.* 2003). De este modo las secuencias obtenidas se pueden clasificar en Unidades Taxonomicas Operativas (OTU, del

inglés Operational Taxonomic Units) y a niveles taxonómicos desde orden hasta género y con ello se determina la biodiversidad de especies y, por tanto, la riqueza bacteriana en la muestra (Escalante, *et al.* 2014; Frank and Pace 2008; Cole, *et al.* 2003).

Las OTU se utilizan para clasificar las bacterias según la similitud de secuencia, particularmente en los enfoques de metagenómica 16S, las OTU son un grupo de variantes de secuencia similares de la secuencia del gen marcador de ADNr 16S. Cada uno de estos grupos está destinado a representar una unidad taxonómica a un determinado nivel taxonómico dependiendo del umbral de similitud de secuencia, por ejemplo, una similitud del 97% de las secuencias del gen 16S se usará para distinguir las bacterias a nivel de género (Edgar, 2018).

Caracterizar la estructura del MI es el primer paso importante para el subsecuente estudio de las interacciones microorganismo-microorganismo y hospedero-microorganismo con lo que muestra un gran potencial para evaluar la salud en fauna silvestre (Zoetendal, 2004; Hale *et al.* 2015; Obregón-Tito, 2015;). Además, caracterizar comunidades microbianas y sus funciones en poblaciones que viven estilos de vida relativamente ancestrales (sea el caso de los hábitats conservados), es esencial para la comprensión de la coevolución de los primates con su microbiota (Obregón-Tito, 2015).

La variabilidad inherente de los sistemas naturales sugiere que la investigación del microbioma intestinal de los mamíferos silvestres puede proporcionar una mayor comprensión de esta relación funcional (Nelson, 2012), lo que permitiría la identificación de los procesos cruciales que influyen en la microbiota intestinal y que son relevantes para el estilo de vida natural de los monos aulladores, así como las implicaciones del cautiverio, pues en esos casos, estudios funcionales muestran que las perturbaciones en el microbioma o las modificaciones causadas por cambios drásticos en la dieta pueden ser perjudiciales para la salud (Blumberg and Powrie, 2012; Holmes, *et al.* 2012).

#### *F) Importancia de las bifidobacterias.*

A principios de 1900 se documentaron las primeras investigaciones científicas de bacterias con beneficios a la salud. Un ejemplo de estas son las observaciones hechas por Henri Tissier quien propuso el uso de “bacterias bífidas” para el tratamiento y prevención de diarreas en niños (López-Brea and Domingo, 2007) y los trabajos sobre la “flora intestinal” realizados por Metchnikoff en 1910 (Fuller, 1992). En la era de la microbiología moderna los efectos benéficos de algunas

bacterias en la salud, se atribuyen al balance del microbioma intestinal (Schrezenmeir and de Vrese, 2001).

Las bacterias pertenecientes al género *bifidobacterium* son uno de los mejores ejemplos de bacterias benéficas, representando aproximadamente el 90% de la población bacteriana del colon (Desjardins *et al.* 1990 y Lapiere *et al.* 1992). Son consideradas como bacterias no patógenas y habitantes naturales del intestino de muchas especies, incluido el hombre; fueron aisladas por primera vez por Henry Tissier en 1900, quien las denominó *Bacillus bifidus communis* debido a su morfología de bacilos cortos ramificados en forma de Y, aunque también pueden ser en forma de V (Shah, 1997) e incluso algunas pueden verse solo como pequeños bacilos curvos o con formas irregulares (Park, 2011).

Las bifidobacterias son anaerobios estrictos, gram-positivas y con actividad catalasa negativa (Marteau, *et al.* 1995, Salminen, *et al.* 1998). Se caracterizan por producir ácido acético y ácido láctico que les permite controlar la microbiota potencialmente patógena en el intestino (Fanning *et al.*, 2012). No producen CO<sub>2</sub> ni los ácidos butírico y propiónico y llevan a cabo la degradación de hexosas exclusiva y específicamente por la ruta de la fructosa-6-fosfato (Collado, 2004), mediante la acción de la enzima fructosa-6-fosfato- fosfo-cetolasa (F6PPK), que además de ser la responsable del metabolismo de los carbohidratos también puede ser utilizada como método de identificación (Shah, 2000).

En cultivo, las bifidobacterias crecen a temperaturas de 36 hasta 43°C. El pH adecuado para su crecimiento es de 6.5 - 7, siendo un pH 5 su límite inferior de crecimiento y 8 el superior. El medio de cultivo más adecuado para el crecimiento de las bifidobacterias es el Triptona, Peptona y extracto de levadura o TPY (Scardovi 1986).

En el hospedero, las bifidobacterias juegan un importante papel en la degradación de carbohidratos complejos no digeribles incluyendo la celulosa, los xilanos, la mucina, la pectina y la inulina, los monosacáridos son utilizados como intermediarios en la vía de fermentación de la hexosas o fructosa 6- fosfato (Bifid shunt) y finalmente son fermentados en el colon para producir ácido acético y ácido láctico que proveen de energía al hospedero, (Pokusaeva, *et al.* 2011).

Asimismo, los productos del metabolismo microbiano actúan como moléculas de señalización e influyen en el metabolismo del hospedero, pues si bien, actúan directamente en el intestino, también pueden influir en el funcionamiento del hígado a través del metabolismo de ácidos biliares y en el cerebro a través del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) afectando una

variedad de comportamientos complejos incluyendo la conducta social, emocional, aprendizaje y ansiedad (Neufeld *et al.* 2011; Collins *et al.*, 2012) además de tener repercusiones en el tejido adiposo y muscular que determina la condición corporal (Tremaroli and Bäckhed, 2012).

Debido a estas características se ha catalogado como uno de los principales microorganismos seleccionados como probióticos, además, las secuencias del genoma de diferentes cepas de *Bifidobacterium* han y continuarán proporcionando información teórica sobre el metabolismo de carbohidratos, que pueden ayudar a estas bacterias a adaptarse al medio gastrointestinal y a interactuar con su hospedero.

Con base en lo anterior, resulta de suma importancia, conocer las interacciones entre hábitat, hospedero y composición del microbioma en *Alouatta pigra*, aunado a que dicha temática ha sido escasamente estudiada en esta especie. Los datos generados en este estudio brindarán información novedosa y aplicable a los esfuerzos de conservación del mono aullador negro, tanto *in situ* como *ex situ*.

## Referencias

- Aagaard K., Petrosino J., Keitel W., Watson M., Katancik J., Garcia N., Patel S., Cutting M., Madden T., Hamilton H., Harris E., Gevers D., Simone G., McInnes P. and Versalovicp. (2012). The Human Microbiome Project strategy for comprehensive sampling of the human microbiome and why it matters. *The FASEB Journal. Research Communication*. Vol. 27 No. 3 1012-1022.
- Amato KR., Yeoman CJ., Kent A., Righini N., Carbonero F., Estrada A., Gaskins H., Stumpf RM., Yildirim S., Torralba M., Gillis M., Wilson BA., Nelson KE., White BA. and Leigh SR. (2013). Habitat degradation impacts black howler monkey (*Alouatta pigra*) gastrointestinal microbiomes. *The ISME Journal* 7, 1344–1353.
- Amato KR., Leigh SR., Kent A., Mackie RI., Yeoman CJ., Stumpf RM., Wilson BA., Nelson A., White BA. and Garber PA. (2015). The Gut Microbiota Appears to Compensate for Seasonal Diet Variation in the Wild Black Howler Monkey (*Alouatta pigra*). *Microb Ecol* 69:434–443. 19.
- Améndola PM. (2009). Estudio de la variabilidad genética en poblaciones de *Alouatta pigra* del Estado de Campeche: Implicaciones para la conservación. Tesis de Doctorado. Instituto de Ecología A. C., Xalapa, Veracruz, México.
- Aivelo T., Laakkonen, J., and Jernvall, J. (2016). Population-and individual-level dynamics of the intestinal microbiota of a small primate. *Appl. Environ. Microbiol.*, 82(12), 3537-3545.
- Arroyo-Rodríguez V. and Mandujano S. (2006). Forest fragmentation modifies habitat quality for *Alouatta palliata*. *International Journal of Primatology*, 27(4), 1079-1096.
- Bailey M. T., and Coe, C. L. (2002). Endometriosis is associated with an altered profile of intestinal microflora in female rhesus monkeys. *Human reproduction*, 17(7), 1704-1708.
- Bailey M. T., Lubach, G. R., and Coe, C. L. (2004). Prenatal stress alters bacterial colonization of the gut in infant monkeys. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 38(4), 414-421.

- Bengis RG., Kock RA. and Fischer J. (2002). Infectious animal diseases: the wildlife/livestock interface. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties* 21(1), 53-65.
- Blumberg R. and Powrie F. (2012). Microbiota, disease, and back to health: a metastable journey. *Sci Transl Med*; 4(137).
- Brambilla G. and De Filippis S. (2005). Trends in animal feed composition and the possible consequences on residue tests. *Analytica Chimica Acta* 529: 7–13, C.
- Breznak JA. and Pankratz S. (1997). In Situ Morphology of the Gut Microbiota of Wood-Eating Termites [*Reticulitermes flavipes* (Kollar) and *Coptotermes formosanus Shiraki*]. *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 33 No. 2. P. 406-426.
- Brook RK., and McLachlan SM. 2006. “Factors influencing farmers’ concerns regarding bovine tuberculosis in wildlife and livestock around Riding Mountain National Park.” *Journal of Environmental Management* 80: 156–166.
- Chapman CA. (1990). Ecological constraint opens a group size in three species of neotropical primates. *Folia Primatol* 55:1-9.
- Chapman CA., and Chapman LJ. (2002). Foraging challenges of red colobus monkeys: influence of nutrients and secondary compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 133(3), 861-875.
- Cole JR., Chai B., Marsh TL., Farris RJ., Wang Q., Kulam SA., Chandra S., McGarrell DM., Schmidt TM., Garrity GM., Tiedje JM. (2003). The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Res*: 31: 442-443.
- Collado AMC. (2004). Caracterización de Cepas del Género bifidobacterium con Carácter Probiótico. Tesis Dostoral. Escuela Superior de Ingenieros Agrónomos. Departamento de Biotecnología Universidad Politécnica de Valencia, España.
- Collins SM., Surette M. and Bercik P. (2012). The interplay between the intestinal microbiota and the brain. *Nature Reviews Microbiology*, 10(11), 735-742.

- Daszak P., Cunningham AA. and Hyatt AD. (2000). Emerging infectious diseases of wildlife - threats to biodiversity and human health. *Science* 287, 443-449.
- Daszak P., Cunningham AA. and Hyatt AD. (2001). Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. *Acta Tropica* 8(2), 103-116.
- Dias PAD., and Rangel-Negrín A. (2015). Diets of howler monkeys. In *Howler Monkeys* (pp. 539-566). Springer, New York.
- Duarte-Quiroga A. and Estrada A. (2003). Primates as Pets in Mexico City: An Assessment of the Species Involved Source of Origin, and General Aspects of Treatment. *American Journal of Primatology* 61:53-60.
- Edgar RC. (2018). Updating the 97% identity threshold for 16S ribosomal RNA OTUs. *Bioinformatics*, 34(14), 2371-2375.
- Ehrlich SD. and MetaHIT Consortium. (2011). MetaHIT: The European Union Project on metagenomics of the human intestinal tract. In *Metagenomics of the human body* (pp. 307-316). Springer, New York, NY.
- Escalante AE., Jardón BL., Ramírez-Barahona S. and Eguiarte LE. (2014). The study of biodiversity in the era of massive sequencing. *Rev Mex de Biodiv*; 85: 1249-1264.
- Estrada A. and Coates-Estrada R. (1996). Tropical Rain Forest Fragmentation and Wild Populations of Primates at Los Tuxtlas, México. *International Journal of Primatology*, Vol. 17, No. 5.
- Fanning S., Hall LJ., Cronin M., Zomer A., MacSharry J., Goulding D., ...and van Sinderen D. (2012). Bifidobacterial surface-exopolysaccharide facilitates commensal-host interaction through immune modulation and pathogen protection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(6), 2108-2113.
- Finch TM. (2003). A Noninvasive Approach to Understanding Adaptation, Crop Raiding Behavior, and the Fecal Microbiota of the African Elephant. Tesis Doctoral. Doctor of Philosophy at the University of Missouri.
- Fischer JR. and Gerhold R. (2002). La fauna silvestre como factor de riesgo para la salud animal y las zoonosis. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). OIE, 281-289.



- Frank DN., Pace NR. (2008). Gastrointestinal microbiology enters the metagenomics era. *Current opinion in gastroenterology*. 24(1): 4-10. Epub 2007/11/29.
- Fraune S., and Bosch, TC. (2010). Why bacteria matter in animal development and evolution. *Bioessays*, 32(7), 571-580.
- Fuller R. (1992). Probiotics. *The Scientific Basis*. Vol.1. Ed. Chapman & Hall, London. 389
- Giacometti M., Frey J. and Abidoetal M. (2000). Infectious keratoconjunctivitis. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 142, 235-240.
- Giglio ND., Burgos F., and Cavagnari BM. (2013). Gut microbiota: its clinical implications in the human body. *Archivos argentinos de pediatria*, 111(6), 523.
- Goldberg TL., Gillespie TR., Rwego IB., Estoff EL. and Chapman CA. (2008). Forest Fragmentation as Cause of Bacterial Transmission among Nonhuman Primates, Humans, and Livestock, Uganda. *Em Infec Dis*. Vol. 14, No. 9, 1375- 1382.
- Gonzalez-Espinoza M., Ramírez-Marcial N. and Ruíz-Montoya L. (2006). Diversidad biológica en Chiapas, prim. Edición, Ed. Plaza y Valdés S.A de C.V. Barcelona, España. Pp 234.
- Greene L. K., Bornbusch, S. L., McKenney, E. A., Harris, R. L., Gorvetzian, S. R., Yoder, A. D., and Drea, C. M. (2019). The importance of scale in comparative microbiome research: New insights from the gut and glands of captive and wild lemurs. *American journal of primatology*, e22974.
- Gual-Sill F. and Rendón-Franco E. (2011). Primates Mexicanos en Cautiverio. En Días P.A.; Rangel N. A. y Canales E. D. *La conservación de los primates en México*. Pp 59-77.
- Hale VL., Tan ChL., Knight and Amato KR. (2015). Effect of preservation method on spider monkey (*Ateles geoffroyi*) fecal microbiota over 8 weeks. *Jour mibiol methods* 113 (2015) 16-26.
- Haros, M., Collado, M. C., Herranz, Y. S., & Dalmau, J. (2004). Funciones metabólicas y nutricionales de la microbiota intestinal y su modulación a través de la dieta: probióticos y prebióticos. *Acta pediátrica española*, 62(11), 520-526.
- Handelsman J., Rondon MR., Brady SF., Clardy J., Goodman RM. (1998). Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry and biology*. 5(10): R 245-9.

- Harzallah D and Belhadj H. (2013). Lactic acid bacteria as probiotics: characteristics, selection criteria and role in immunomodulation of human GI mucosal barrier. *Health Livest Purp*:197-217.
- Herter CA., and Kendall AI. (1910). The influence of dietary alternations on the types of intestinal flora. *Journal of Biological Chemistry*, 7(3), 203-236.
- Holmes E., Kinross J., Gibson GR., Burcelin R. (2012). Therapeutic modulation of microbiota-host metabolic interactions. *Sci Transl Med*; 4(137):137rv6.
- Hume ID. (2002). Digestive strategies of mammals. *Acta Zool Sin/Dongwu Xuebao* 48:1–19
- Jarquín-Díaz VH., Barbachano-Guerrero A., Maldonado-Rodríguez R., Vásquez-Aguilar AA. and Aguila-Faisal L. (2016). First molecular evidence of *Hepatozoon canis* in domestic dogs and ticks in fragmented rainforest areas in Mexico. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vprsr.2016.11.001>
- Kagambèga A., LienemannT., Aulu L., Traoré A., Barro N., Siitonen A. and Haukka K. (2013). Prevalence and characterization of *Salmonella enterica* from the feces of cattle, poultry, swine and hedgehogs in Burkina Faso and their comparison to human *Salmonella* isolates. *BMC Microbiology*, 13:253
- López-Brea M. and Domingo D. (2007). Antibioticoterapia con Probióticos. *Rev Esp Quimioterap*; Vol. 20. Nº 2: 170-181.
- McKenna P., Hoffmann, C., Minkah, N., Aye, P. P., Lackner, A., Liu, Z., and Bushman, F. D. (2008). The macaque gut microbiome in health, lentiviral infection, and chronic enterocolitis. *PLoS pathogens*, 4(2), e20.
- McKenney E. A., Rodrigo, A., and Yoder, A. D. (2015). Patterns of gut bacterial colonization in three primate species. *PloS one*, 10(5), e0124618.
- Marsh LK., Cuarón A.D., Cortés-Ortiz L., Shedden A., Rodríguez-Luna E. and de Grammont PC. (2008). *Alouatta pigra*. The IUCN Red List of Threatened Species. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T914A13094441.en>.

- Mayor P. and López C. (2012). Atlas de Anatomía de Especies Silvestres de la Amazonia Peruana. <http://atlasanatomiaamazonia.uab.cat>.
- Messenger AM., Barnes AN. AND Gray GC. (2014). Reverse zoonotic disease transmission (zooanthroponosis): a systematic review of seldom documented human biological threats to animals. PLoS ONE 9(2), e89055.
- Metchnikoff E. (1908). "Etude sur la flore intestinale". "Annales de l'Institut Pasteur", t. XXII, pp. 929-955, ext. Paris.
- Milton K. (1980). The Foraging Strategy of Howler Monkeys: A Study in Primate Economics. New York: Columbia University Press.
- Moeller A. H., Foerster, S., Wilson, M. L., Pusey, A. E., Hahn, B. H., & Ochman, H. (2016). Social behavior shapes the chimpanzee pan-microbiome. Science Advances, 2(1), e1500997.
- Nagy AK. and Milton K. (1979). Energy Metabolism and Food Consumption by Wild Howler Monkeys (*Alouatta Palliata*). Ecology, Vol. 60, No. 3, pp. 475-480
- Nakamura N., Amato KR., Gerber P., Estrada A., Mackie RI. and Gaskins HR. (2011). Analysis of the hydrogenotrophic microbiota of wild and captive black howler monkeys (*Alouatta pigra*) in Palenque National Park, México. Am. J. Prim. Vol. 73 (9). 909-919.
- Nelson T. (2012). Factors Influencing the Gut Microbiota of Antarctic Seals. Thesis for the degree of Doctor of Philosophy. Evolution & Ecology Research Centre School of Biological, Earth & Environmental Sciences University of New South Wales, Sydney, Australia.
- Neufeld KM., Kang N., Bienenstock J. and Foster JA. (2011). Reduced anxiety-like behavior and central neurochemical change in germ-free mice. Neurogastroenterology & Motility, 23(3), 255-e119.
- Nidasio de la Cerda GR. (2002). Caracterización de la Dieta y su Contribución en el Establecimiento de Parámetros de Nutrientes Sanguíneos para el Mono Saraguate (*Alouatta pigra*) Cautivo en el Zoológico Nacional de la Aurora. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos, Guatemala.

- Obregon-Tito AJ., Tito RY., Metcalf J., Sankaranarayanan K., Clemente JC., Ursell LK., and Spicer P. (2015). Subsistence strategies in traditional societies distinguish gut microbiomes. *Nature communications*, 6, 6505.
- Ochman H., Worobey, M., Kuo, C. H., Ndjango, J. B. N., Peeters, M., Hahn, B. H., and Hugenholtz, P. (2010). Evolutionary relationships of wild hominids recapitulated by gut microbial communities. *PLoS biology*, 8(11), e1000546.
- Palmer MV., Thacker TC., Waters WR., Gortazar C. and Corner LA. (2012). *Mycobacterium bovis*: a model pathogen at the interface of livestock, wildlife, and humans. *Veterinary Medicine International*. doi:10.1155/2012/236205.
- Pastor\_Nieto R. (2015). Health and Welfare of Howler Monkeys in Captivity. En Kowalewski (eds.), *Howler Monkeys, Developments in Primatology: Progress and Prospects*; Chapter 12, Pp 313-355.
- Pérez-Gil R., Jaramillo MF., Muñiz SAM. and Torres GM. (1996). Proyecto de importancia económica de los vertebrados silvestres de México. CONABIO. México. D. F. 215pp.
- Petersen C. and Round JL. (2014). Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. *Cellular microbiology*, 16 (7), 1024-1033.
- Pokusaeva K., Fitzgerald GF. and van Sinderen D. (2011). Carbohydrate metabolism in *Bifidobacteria*. *Genes & Nutrition*, 6(3), 285-306.
- Pozo-Montuy G. and Serio-Silva JC. (2006). Comportamiento Alimentario de Monos Aulladores Negros (*Alouatta pigra lawrense cebidae*) en Hábitat Fragmentado en Balancán, Tabasco, México. *Acta Zoológica Mexicana* (n.s.) 22 (3): 53-66.
- Qin J., Li R., Raes J., Arumugam M., Burgdorf KS., Manichanh C., ... and Mende DR. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *nature*, 464(7285), 59-65.
- Rajilic-Stojanovic M. (2007). Diversity of the human gastrointestinal microbiota: novel perspectives from high throughput analyses. PhD Thesis. Wageningen, the Netherlands: Wageningen University.

- Rhyan JC. and Spraker TR. (2007). Emergence of diseases from wildlife reservoirs. *Veterinary Pathology* 47(1), 34-39.
- Rwego IB., Isabirye-Bautista G., Gillespie RT. and Goldberg TL. Gastrointestinal Bacterial Transmission among Humans, Mountain Gorillas, and Livestock in Bwindi Impenetrable National Park, Uganda. *Conservation Biology*, Volume 22, No. 6, 1600–1607.
- Sasseville V. G., and Diters, R. W. (2008). Impact of infections and normal flora in nonhuman primates on drug development. *ILAR journal*, 49(2), 179-190.
- Scardovi V. (1981). The genus *Bifidobacterium*. en "The Prokaryotes" vol II. Ed. M. Starr, H. Stolp, H.G. Truper, A. Balows and H.G. Schlegel. Cap 149. Springer-verlag. N.Y.
- Schrezenmeir J. and de Vrese M. (2001). Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2), 361s-364s.
- Serio-Silva JC., Rico-Gray V. (2002). Interacting of forest fragmentation and howler monkey foraging on germination and dispersal of fig seeds. *Oryx*, The International Journal of Conservation, 36 (3): 266-271.
- Shah N. P. (2000). Probiotic Bacteria: Selective Enumeration and Survival in Dairy Foods. *J Dairy Sci* 83:894-9
- Shapira M. (2016). Gut Microbiotas and Host Evolution: Scaling Up Symbiosis Trends in Ecology & Evolution, July 2016, Vol. 31, No. 7. 539-549.
- Shulman ST., Friedmann HC., Sims RH. (2007). Theodor Escherich: The First Pediatric Infectious Diseases Physician? *Clinical Infectious Diseases*; 45:1025–9
- Silva M., Jacobus NV., Deneke C., Gorbach S.L. (1987). Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 31, 1231–1233.
- Smith KF., Acevedo-Whitehouse K. and Pedersen AB. (2009). The role of infectious diseases in biological conservation. *Animal Conservation*. doi: 10.1111/j.1469- 1795.2008.00228.x.

- Stumpf R. M., Gomez, A., Amato, K. R., Yeoman, C. J., Polk, J. D., Wilson, B. A., and Leigh, S. R. (2016). Microbiomes, metagenomics, and primate conservation: New strategies, tools, and applications. *Biological Conservation*, 199, 56-66.
- Suau A., Bonnet R., Sutren M., Godon JJ., Gibson GR., Collins MD. and Doré J. (1999). Nv tkr.gg, nng. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl Environ Microbiol* 65: 4799–4807.
- Summers AO., Wireman J., Vimy MJ., Lorscheider FL., Marshall B., Levy SB., ... and Billard L. (1993). Mercury released from dental " silver" fillings provokes an increase in mercury-and antibiotic-resistant bacteria in oral and intestinal floras of primates. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 37(4), 825-834.
- SEMARNAT. (2010). Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010.
- Tremaroli V. and Bäckhed F. (2012). Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*, 489(7415), 242-249.
- Uchii K., Matsui K., Yonekura R., Tani K. Kenzaka K., Nasu M. and Kawabata K. (2006). Genetic and Physiological Characterization of the Intestinal Bacterial Microbiota of Bluegill (*Lepomis macrochirus*) with Three Different Feeding Habits. *Micobiol Ecology*, Volume 51, 277–283.
- Ullrey D. and Allen ME. (1986). Principles of zoo mammal nutrition. In Fowler, M.E. Zoo and wild animáis medicine. 2 ed, EE.UU. W.B. Saunders. p. 516- 532.
- Uenishi G., Fujita, S., Ohashi, G., Kato, A., Yamauchi, S., Matsuzawa, T., and Ushida, K. (2007). Molecular analyses of the intestinal microbiota of chimpanzees in the wild and in captivity. *American Journal of Primatology: Official Journal of the American Society of Primatologists*, 69(4), 367-376.
- Wang R. F., Cao, W. W., and Cerniglia, C. E. (1996). PCR detection and quantitation of predominant anaerobic bacteria in human and animal fecal samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62(4), 1242-1247.
- West AG., Waite DW., Deines P., Bourne DG., Digby A., McKenzie VJ. and Taylor MW. (2019). The microbiome in threatened species conservation. *Biol Conserv*, 229, 85-98.

Wong S. and Rawls JF. (2012). Intestinal microbiota composition in fishes is influenced by host ecology and environment. *Molecular Ecology* 21, 3100–3102

Zoetendal EG., Collier CT., Koike S., Mackie RI. and Gaskins R. (2004). Molecular ecological Analysis of the gastrointestinal microbiota: a Review. *Am Soc for Nut Sci* 0022-3166/04.

Zoetendal EG., Akkermans AD., and de Vos WM. (1998). Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host specific communities of active bacteria. *Appl Environ Microbiol* 64: 3854–3859.

### III. OBJETIVOS

#### *A) Objetivo General*

- Conocer la conformación de la microbiota intestinal de los monos aulladores negros, así como la influencia que tienen el hábitat, la temporalidad y la alimentación en su estructura.

#### *B) Objetivos Específicos*

- Identificar especies de bifidobacterias presentes en la microbiota intestinal de monos aulladores negros silvestres por medio de técnicas moleculares.
- Describir la dieta de los monos aulladores de la región y su relación con el hábitat.
- Describir y comparar la diversidad microbiana intestinal de los monos aulladores de vida libre y en cautiverio.
- Evaluar si hay diferencias en la diversidad y abundancia relativa de OTUs bacterianos de *A. pigra* de acuerdo con la selección de recursos alimentarios en tres temporadas distintas (lluvias, nortes y secas).
- Evaluar si existe variación en diversidad y abundancia de OTUs bacterianos entre los monos de un hábitat ribereño y uno de zona alta.
- Conocer si la interacción con fauna doméstica puede estar influyendo en la conformación de la MI de los monos.



## **IV. PRODUCTOS ACADÉMICOS**

**A) Molecular detection of *Bifidobacterium* spp. in faeces of black howler monkeys (*Alouatta pigra*). Hernández-Rodríguez D, Vásquez-Aguilar A.A, Serio-Silva J.C., Rebollar E.A., Azaola-Espinosa, A. 2019. JOURNAL OF MEDICAL PRIMATOLOGY. 48: 99-105 <https://doi.org/10.1111/jmp.12395>.**



# Molecular detection of *Bifidobacterium* spp. in faeces of black howler monkeys (*Alouatta pigra*)

Dolores Hernández-Rodríguez<sup>1,2</sup> | Antonio Acini Vásquez-Aguilar<sup>3</sup> |  
Juan Carlos Serio-Silva<sup>2</sup> | Eria Alaide Rebollar<sup>4</sup> | Alejandro Azaola-Espinosa<sup>5</sup> 

<sup>1</sup>Doctorado en Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Coyoacán, CDMX, México

<sup>2</sup>Instituto de Ecología, A.C. Red de Biología y Conservación de Vertebrados, Xalapa, Veracruz, México

<sup>3</sup>Instituto de Ecología, A.C. Red de Biología Evolutiva, Xalapa, Veracruz, México

<sup>4</sup>Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México

<sup>5</sup>Sistemas Biológicos, Laboratorio de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Coyoacán, CDMX, México

## Correspondence

Alejandro Azaola-Espinosa, Sistemas Biológicos, Laboratorio de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Coyoacán, CDMX, México.  
Email: azaola@correo.xoc.uam.mx

## Funding information

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

## Abstract

**Background:** *Bifidobacterium* genus are considered to be beneficial bacteria for their hosts; however, knowledge about the specific species that are part of the gut microbiome of howler monkeys is scarce. Polymerase chain reaction (PCR) is a useful technique for the identification of non-cultivable or difficult to grow bacterial species. With the goal of detecting species of the genus *Bifidobacterium* in black howler monkeys, we used PCR on DNA derived from faecal samples.

**Methods:** We collected and extracted DNA from 40 faecal samples. Using specific primers, we performed PCR and nested PCR to detect members of the *Bifidobacterium* genus and a subset of species: *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum* and *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis*.

**Results:** 97.5% (39/40) of the samples were positive for *Bifidobacterium* spp. We found *B longum* in 100% of the analysed samples.

**Conclusions:** This is the first report of *B longum* in black howler monkey faeces.

## KEYWORDS

*Alouatta pigra*, *Bifidobacterium longum*, PCR, probiotics, Tabasco

## 1 | INTRODUCTION

The genus *Bifidobacterium* includes pleomorphic strict anaerobic Gram-positive bacteria rich in C + G; certain species commonly dominate the gut microbiota of humans and other animals. They are a group with very homogeneous characteristics. However, some properties may be influenced by the bacteria's host, including the host's phylogeny.<sup>1-5</sup> Members of the genus *Bifidobacterium* have been identified in the faeces of human infants and can be found in highly diverse ecological niches including the human, animal and insect gastrointestinal tract, oral cavity, sewage water, blood and food.<sup>2,5-7</sup> Up to now, 48 species within the genus have been identified on animal hosts.<sup>8</sup>

The isolation of *Bifidobacterium* is difficult because this bacterium requires protein hydrolysates as the nitrogen source as well as anaerobic conditions. These anoxic conditions require reducing

agents (like CO<sub>2</sub>) in the culture medium for optimal growth.<sup>9</sup> For this reason, polymerase chain reaction (PCR) technique has been used for the identification of species that are difficult to isolate in culture. Currently, PCR and sequencing of the 16S rRNA gene are the most useful tools for identifying symbiotic and environmental microorganisms.<sup>1,2,7,10-12</sup>

Members of the genus *Bifidobacterium* are considered to be beneficial (probiotic) bacteria for their hosts, because they stimulate the host's immune system and produce organic acids and hydrogen peroxide that inhibit the growth of many pathogens (bacteria, fungi and viruses) by competitive exclusion.<sup>13-15</sup> Several studies, including clinical and laboratory trials, have identified many of the benefits obtained from the presence of bifidobacteria, including clear beneficial effects on the host species.<sup>16-19</sup> However, until now, its application as a probiotic has not been tested in wild animals in captivity.<sup>2</sup>

Recently, some bacteria from the human intestinal gut tract (mainly from the genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*) were recognised as promoting health when supplied as a probiotic.<sup>17,18</sup> The use of these probiotic bacteria has a better health effect when they come from the same animal species.<sup>20</sup> Probiotics supplied to animals in captivity as part of their diet could help promote better health status, since many of the problems associated with raising animals in captivity are related to digestive disorders.<sup>13</sup>

*Alouatta* spp. is a neotropical primate genus that includes 11 species distributed from Mexico to Argentina. In Mexico, there are two howler monkey species: the Mexican mantled howler monkey (*Alouatta palliata mexicana*) and the Mexican black howler monkey (*Alouatta pigra*).<sup>21</sup> Both species inhabit the tropical rainforest areas of the states of Chiapas, Campeche, Quintana Roo, Tabasco, Veracruz and Yucatan, and they are considered critically endangered species according to the IUCN Red List.<sup>22</sup> Unfortunately, both of these primate species have been severely affected by habitat loss and fragmentation, illegal trade and pet use.<sup>23,24</sup> When monkeys are recovered from pet trafficking, most of the time they are sent to rehabilitation locations where they have a low life expectancy due to health problems associated with alterations in their gut microbiota.<sup>25-27</sup> Howler monkeys (*Alouatta* spp.) largely depend on their intestinal microbiota for fibre decomposition and energy production, because they get more than 33% of their daily energy from the microbial production of volatile fatty acids.<sup>27</sup> In the wild, primate species have a variable diet that includes leaves, fruits, flowers and sometimes bark.<sup>28</sup> In captivity, these primates do not have access to their natural diet, so they suffer from gastrointestinal and respiratory diseases with high mortality rates.<sup>23,29</sup>

In the present study, we determined the presence of *Bifidobacterium* in the faeces of free-living black howler monkeys

(*A pigra*), through the use of standard molecular methods with specific primers designed to identify *Bifidobacterium* species.

## 2 | METHODS

### 2.1 | Humane care guidelines

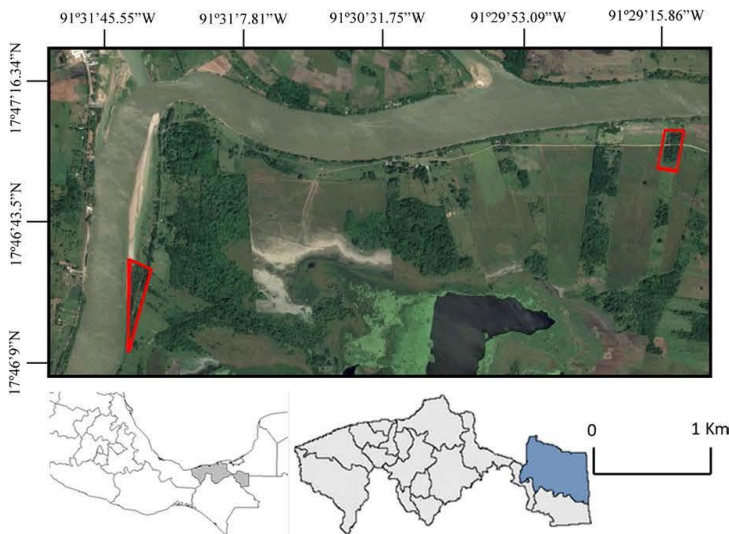
The protocols and procedures were reviewed and approved by the Academic and Ethical Committee of the Animal and Agricultural Sciences PhD. Program of the Universidad Autónoma Metropolitana. Faecal samples were taken carefully, and the howler monkey troops were not disturbed.

### 2.2 | Study site

The study was performed in the local settlement "Josefa Ortiz de Domínguez" near the Usumacinta river basin, where the Estación de Investigación Primatológica y Vida Silvestre is located in the municipality of Balancán, Tabasco, Mexico (17°46'48.46"N and 91°30'22.11"W; Figure 1). This area is part of a highly fragmented landscape, where original floodplain forests have undergone severe degradation, losing around 80% of their original cover due to human activities including livestock areas, farmland and perturbed forest,<sup>30,31</sup> with the presence of domestic animals like pigs, goats, sheep, cows and dogs.<sup>32</sup>

### 2.3 | Subject animals

We studied two troops of black howler monkeys inhabiting two forest fragments (site 1 and site 2) separated approximately by 4 km (Figure 1). The howler troops were composed of, four adult males, four juvenile males, nine adult females, three juvenile females and one infant and at site 1, and six adult males, four juvenile males, five adult females, three juvenile females and one infant at site 2. These two troops have been



**FIGURE 1** Collection sites of black howler monkey (*Alouatta pigra*) faeces in the Balancán Tabasco, Mexico. The red lines represent areas of fragmented rainforest used for sample collection

continuously monitored since 2007, as they are considered a sentinel species and are part of several studies carried out in the area.<sup>24,30-34</sup>

## 2.4 | Faecal collection and sample preparation

During January-August 2016, faecal samples were collected from 40 animals, 21 from site 1 and 19 from site 2. Individuals from each of the troops were followed until faecal deposition, and then each individual was identified by a tag name included in previous studies and sexed. We collected a portion of faeces (5-10 g) from each black howler monkey immediately after defecation. Samples were stored in individual sterile tubes containing 99% ethanol and stored at 4°C until DNA extraction was carried out for subsequent molecular analyses.

## 2.5 | DNA extraction

DNA was extracted from individual stool samples using the ZR Fecal DNA Miniprep™ kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) following the manufacturer's instructions. The concentration and quality of the extracted DNA were measured using a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). All DNA samples were stored at -20°C until use.

## 2.6 | PCR amplification

Polymerase chain reaction amplification was carried out using two sets of primers targeted to the 16S rRNA gene that were specifically designed to detect members of the *Bifidobacterium* genus (Table 1). Primers g-Bifid-F/g-Bifid-R, designed by Matzuki et al.,<sup>11</sup> amplified a fragment of 549-563 bp of the 16S rRNA gene, while primers Lm3/Lm26, designed by Kaufmann et al.,<sup>10</sup> amplified a fragment of 1.35 kb. Subsequently, nested PCR was carried out on the amplicons obtained with the Lm3/Lm26 primers, using specific primers for the detection of *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum* and *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis*. The sequences of the primers used in the PCR analysis are shown in Table 1.

DNA amplification was carried out using a thermal cycler (ABI Veriti™ Thermal Cycler, Waltham, MA, USA). Reactions contained 5 µL of 5× buffer (Promega, Madison, WI, USA), 1.5 µL MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L), 2.25 µL dNTPs mix (8 mmol/L), 0.90 µL of each primer (10 µmol/L), 0.25 µL Taq polymerase (5 U/µL; Promega) and 5 µL of template DNA; dH<sub>2</sub>O was added to achieve a final volume of 25 µL. PCR conditions consisted of an initial denaturation time of 5 minutes at 94°C, followed by 35 cycles of 20 seconds at 94°C, 20 seconds at the appropriate annealing temperature (Table 1) and 30 seconds at

**TABLE 1** *Bifidobacterium* species- and group-specific primers based on 16S rRNA sequences used in this study

Target bacterial group	Sequence	Target gene	Size (bp)	Annealing temperature	Reference
Genus <i>Bifidobacterium</i>	g-Bifid-F: 5'-CTCCTGGAACGGGTGG-3' g-Bifid-R: 5'-GGTGTCTCTCCGATATCTACA-3'	16S rRNA gene	549-563	65°C	Matzuki et al. <sup>11</sup>
Genus <i>Bifidobacterium</i>	Lm3: 5'-CGGGTGCTlcccactttcatg-3' Lm26: 5'-GATTCTGGCTCAGGATGAACG-3'	16S rRNA gene	1500	60°C	Kauffman et al. <sup>10</sup>
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	BiADO-1: 5'-CTCCAGTTGGATGCATGTC-3' BiADO-2: 5'-CGAAGGCTTGCTCCAGT-3'	16S rRNA gene	279	55°C	Matzuki et al. <sup>11</sup>
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	BiBIF-1: 5'-CCACATGATCGCATGTGATTG-3' BiBIF-2: 5'-CCGAAGGCTTGCTCCCAA-3'	16S rRNA gene	278	55°C	Matzuki et al. <sup>11</sup>
<i>Bifidobacterium infantis</i>	BiINF-1: 5'-TTCCAGTTGATCGCATGGTC-3' BiINF-2: 5'-GGAACCCCATCTCTGGAT-3'	16S rRNA gene	828	55°C	Matzuki et al. <sup>45</sup>
<i>Bifidobacterium longum</i>	BiLON-1: 5'-TTCCAGTTGATCGCATGGTC-3' BiLON-2: 5'-GGGAAGCCGATATCTCTACGA-3'	16S rRNA gene	831	52°C	Matzuki et al. <sup>45</sup>
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	Bi ani: 5'-GCTACAACTCAAAGCATTAC-3' Bi ani: 5'-GTACTTCGCCTCAGCGAT-3'	16S-23S rRNA intergenic spacer	550	57°C	Hong and Chen <sup>53</sup>

**TABLE 2** Bifidobacterium species detected from the faeces of howler monkeys by polymerase chain reaction (PCR) and nested PCR

Sex and age	Genera Matzuki	Genera Kaufmann	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<i>Bifidobacterium infantis</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>animalis</i>
Site 1							
Male <sup>a</sup>	+	+	-	-	-	+	-
Female <sup>b</sup>	+	+	-	-	-	+	-
Female <sup>c</sup>	+	+	-	-	-	+	-
Male <sup>a</sup>	+	+	-	-	-	+	-
Female <sup>a</sup>	+	+	-	-	-	+	-
Male <sup>c</sup>	+	+	-	-	-	+	-
Female <sup>b</sup>	+	+	-	-	-	+	-
Female <sup>a</sup>	+	+	-	-	-	+	-
Female <sup>c</sup>	+	+	-	-	-	+	-
Male <sup>a</sup>	+	+	-	-	-	+	-
Female <sup>b</sup>	+	+	-	-	-	+	-
Male <sup>a</sup>	+	+	-	-	-	+	-
Female <sup>a</sup>	+	+	-	-	-	+	-
Male <sup>c</sup>	+	+	-	-	-	+	-
Male <sup>c</sup>	+	+	-	-	-	+	-
Male <sup>d</sup>	+	+	-	-	-	+	-
Female <sup>a</sup>	+	+	-	-	-	+	-
Female <sup>a</sup>	+	+	-	-	-	+	-
Male <sup>c</sup>	+	+	-	-	-	+	-
Female <sup>c</sup>	+	+	-	-	-	+	-
Female <sup>a</sup>	+	+	-	-	-	+	-
Site 2							
Male <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-
Male <sup>a</sup>	+	+	-	-	-	+	-
Female <sup>b</sup>	+	+	-	-	-	+	-
Male <sup>a</sup>	+	+	-	-	-	+	-
Female <sup>b</sup>	+	+	-	-	-	+	-
Male <sup>c</sup>	+	+	-	-	-	+	-
Male <sup>d</sup>	+	+	-	-	-	+	-
Female <sup>a</sup>	+	+	-	-	-	+	-
Male <sup>a</sup>	+	+	-	-	-	+	-
Female <sup>a</sup>	+	+	-	-	-	+	-
Male <sup>c</sup>	+	+	-	-	-	+	-
Female <sup>a</sup>	+	+	-	-	-	+	-
Male <sup>a</sup>	+	+	-	-	-	+	-
Female <sup>c</sup>	+	+	-	-	-	+	-
Male <sup>a</sup>	+	+	-	-	-	+	-
Male <sup>c</sup>	+	+	-	-	-	+	-
Female <sup>a</sup>	+	+	-	-	-	+	-
Female <sup>c</sup>	+	+	-	-	-	+	-
Male <sup>c</sup>	+	+	-	-	-	+	-

<sup>a</sup>Howler monkey adult.<sup>b</sup>Howler monkey breeding.<sup>c</sup>Howler monkey juvenile.<sup>d</sup>Howler Monkey infant.

72°C; a final extension step was performed for 5 minutes at 72°C, followed by cooling to 4°C. PCR products were subjected to agarose gel (1.5%) electrophoresis, stained with GelRed (Biotium) and visualised using a transilluminator (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

### 3 | RESULTS

*Bifidobacterium* spp. was detected in 39 of 40 samples (97.5%) of the samples obtained from *A pigra* (Table 2) using the primer sets designed to detect isolates from the genus *Bifidobacterium*, that is, g-Bifid-F/g-Bifid-R. In accordance with the first genus-specific primers, the second pair showed that the same 39/40 samples were positive for *Bifidobacterium* spp. (Table 2).

The results from the nested PCR showed positive results for only *B longum*, in 39 of 39 samples (prevalence of 100%), which showed an expected fragment of approximately 831 bp. The prevalence of the rest of the species analysed in this study (*B adolescentis*, *B bifidum*, *B infantis* and *B animalis* subsp. *animalis*) was 0% (Table 2).

### 4 | DISCUSSION

Previous reports have shown that bacteria from the genus *Bifidobacterium* confer health benefits to the host. Thus, for many years, these bacteria have been used as a probiotic supplement for humans.<sup>7,35-38</sup> Although this genus represents one of the most important bacterial groups in the human and animal gut microbiome, their richness and diversity are unknown in most wildlife hosts, including howler monkeys. Although several studies have been carried out on howler monkey microbiota, such studies have not provided clear information about the presence of *Bifidobacterium* species.<sup>25,29,39-41</sup>

Recently, Orkin et al.<sup>42</sup> determined that the genera *Bifidobacterium* and *Streptococcus* are the most abundant taxa in faecal samples of white-faced capuchins (*Cebus capucinus imitator*). Although this proportion has not been typically reported in other studies of intestinal communities in primates, these results suggest that the members of the genus *Bifidobacterium* are common in the gut microbial community and could play a relevant role in the host intestinal health.

Howler monkeys consume large amounts of fibre in their diet. Thus, it is likely that bacteria from the *Bifidobacterium* genus play important roles in the monkey's digestive system.<sup>27,43</sup> The degradation of diet-derived carbohydrates that cannot be metabolised by the host represents one of the ways in which *Bifidobacterium* species ensure their colonisation and persistence in the gut. The diet-derived, non-digestible carbohydrates utilised by *Bifidobacterium* include oligosaccharides and dietary fibres such as resistant starches, fructans, pectin, cellulose and hemicellulose.<sup>38</sup> This strategy allows for the expansion of the carbohydrate utilisation capabilities of single bifidobacterial strains, while the end products of their metabolic activities may, in turn, be used by other members of the gut community. The main fermentation end products of bifidobacterial carbohydrate metabolism are acetate, lactate and butyrate, which represent a way

of recovering energy. These metabolites are also involved in other beneficial functions in the organism.<sup>38,43</sup>

Our results show that the isolation of bacterial DNA and analysis by PCR could be a useful tool for the molecular identification of species of the genus *Bifidobacterium*. Our results agree with those of Nomoto et al.,<sup>43</sup> who managed to identify two species of *Bifidobacterium* by PCR in the faeces of captive chimpanzees in Japan. Besides this study, some other studies support this technique for the identification of *Bifidobacterium* spp. in faecal samples from several animal species,<sup>44</sup> including humans.<sup>1,12,45,46</sup> Using PCR techniques for *Bifidobacterium* detection could be a good alternative, because detailed identification using microbiological and biochemical methods is challenging<sup>46</sup> and only allows for the detection of bifidobacteria at the genus level. Several authors have shown that the use of molecular techniques offers numerous possibilities in the field of microbial detection and identification.<sup>4,43,44,47</sup>

*Bifidobacterium* genomes contain specific gene cassettes dedicated to the utilisation of various carbohydrates, which are organised in clusters containing one or more glycosyl hydrolase-encoding genes (GH).<sup>37</sup> The GH gene family, essential for the hydrolysis of glycosidic bonds found in plant-derived cell wall oligosaccharides, include genes that code for arabinofuranosidases and xylanases. These genes are typically present in multiple copies in *B longum* subsp. *longum*.<sup>37</sup>

In this study, we detected *B longum* by PCR in the faeces of wild black howler monkeys. This study provides the first report of *B longum* detected in primates from the New World. However, a recent study reported the first isolation of the subspecies *B pseudolongum* subsp. *pseudolongum* in the faeces of captive chimpanzees.<sup>43</sup> Previous studies have established the health benefits obtained from *B longum* in several host species, such as humans. For example, the presence *B longum* has shown protective effects in asthma patients.<sup>48</sup> In humans, *B longum* BORI in combination with *Lactobacillus acidophilus* ADO31 reduces the duration of rotavirus diarrhoea in young children.<sup>49</sup> Mendes et al.<sup>50</sup> showed that preventive supplementation with *B longum* strain 51A attenuates exacerbated airway inflammation and hyperreactivity in ovariectomised mice. Another *B longum* strain, ATCC 157017, produces an organic acid capable of lowering pH and consequently inhibiting the growth of *Clostridium difficile* in mice.<sup>51</sup> Furthermore, oral treatment with *B longum* strain 51A is effective against lung inflammation due to *Klebsiella pneumoniae* infection in mice.<sup>52</sup>

These studies support the possible beneficial functions that *B longum* could have on black howler monkeys. Specifically, we considered that *B longum* could be used as a probiotic in the diet of captive howler monkeys to treat digestive and respiratory diseases. Recently, Anzai et al.<sup>29</sup> reported on a short outbreak in howler monkeys (*Alouatta clamitans*) caused by *K pneumoniae* displaying a hypermucoviscosity phenotype and possibly constituting an emerging wildlife pathogen.

Non-human primates have a high diversity of bacteria on their guts, which is probably related to their habitat and diet,<sup>25</sup> including the presence of *Bifidobacterium* species. Considering these results, *B longum* is presented as a bacterium with high potential for the

development of probiotics for captive howler monkeys, contributing to the maintenance of gastrointestinal health and the treatment of gastrointestinal diseases, although it should be considered that the metabolic characteristics associated with the probiotic function of *Bifidobacterium* are specific to each species and highly correlated with their phylogeny.<sup>3,21</sup>

Several species of *Bifidobacterium*, including *B longum*, have been shown to provide important health benefits, including improved digestion of diet components, a reduction in disease due to colonisation by pathogenic bacteria and others. However, in some animal species, this approach is severely limited due to the frequent reliance on single culturable strains and in vitro systems.<sup>37</sup> We infer that strains hosted by free-range monkeys also generate benefits to these primates and could be used as probiotics in captive populations.

In conclusion, the present study represents the first report of *B longum* in black howler monkey faeces in Mexico. Based on these results, we inferred that *Bifidobacterium* is a common member of the gastrointestinal microbiome of this primate species. At the moment, the role of *B longum* in wild black howler monkeys is unclear. Further studies are required to determine the functions of bacteria from the genus *Bifidobacterium* as well as the benefits to the host.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Laboratorio de Medicina de Conservación of the Instituto Politécnico Nacional (IPN) and the Estación de Investigación Primatológica y Vida Silvestre established in Balancán, Tabasco by Instituto de Ecología A.C. (INECOL) for their support. We also thank Dolores Tejero Geronimo for her help in the field and Arturo Barbachano Guerrero for his contributions to this work. This work constitutes a partial fulfilment on the part of the first author to obtain a PhD degree from the program in Animal and Agricultural Sciences at Universidad Autónoma Metropolitana (Scholarship no. 278987 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología).

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflicts of interest.

#### ORCID

Alejandro Azaola-Espinosa  <https://orcid.org/0000-0002-3850-1244>

#### REFERENCES

- Matsuki T, Watanabe K, Tanaka R, Oyaizu H. Rapid identification of human intestinal bifidobacteria by 16S rRNA-targeted species- and group-specific primers. *FEMS Microbiol Lett*. 1998;167(2):113-121.
- Sun Z, Zhang W, Guo C, et al. Comparative genomic analysis of 45 type strains of the genus *Bifidobacterium*: a snapshot of its genetic diversity and evolution. *PLoS ONE*. 2015;10(2):e0117912.
- Kwak MJ, Kwon SK, Yoon JK, et al. Evolutionary architecture of the infant-adapted group of *Bifidobacterium* species associated with the probiotic function. *Syst Appl Microbiol*. 2016;39(7):429-439.
- Bunešová V, Vlková E, Rada V, Hovorková P, Musilová Š, Kmeř V. Direct identification of bifidobacteria from probiotic supplements. *Czech J Food Sci*. 2014;32(2):132-136.
- Bunesova V, Křil J, Javurkova B, et al. Diversity of the subspecies *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. *Anaerobe*. 2017;44:40-47.
- Dong X, Xin Y, Jian W, Liu X, Ling D. *Bifidobacterium thermacidophilum* sp. nov., isolated from an anaerobic digester. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2000;50(1):119-125.
- Ventura M, Canchaya C, Del Casale A, et al. Analysis of bifidobacterial evolution using a multilocus approach. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2006;56(12):2783-2792.
- List of prokaryotic names with standing in nomenclature. <http://www.bacterio.net/bifidobacterium.html>. Accessed April 2, 2018.
- Nebra Y, Blanch AR. A new selective medium for *Bifidobacterium* spp. *Appl Environ Microbiol*. 1999;65(11):5173-5176.
- Kaufmann P, Pfefferkorn A, Teuber M, Meile L. Identification and quantification of *Bifidobacterium* species isolated from food with genus-specific 16S rRNA-targeted probes by colony hybridization and PCR. *Appl Environ Microbiol*. 1997;63(4):1268-1273.
- Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, et al. Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces. *Appl Environ Microbiol*. 2002;68(11):5445-5451.
- Matsuki T, Watanabe K, Tanaka R. Genus- and species-specific PCR primers for the detection and identification of bifidobacterial. *Intest Microbiol*. 2003;4:61-69.
- Gaggia F, Mattarelli P, Biavati B. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *Int J Food Microbiol*. 2010;141:515-528.
- Russell DA, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C. Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria. *Int J Food Microbiol*. 2011;149(1):88-105.
- Ashraf R, Shah NP. Immune system stimulation by probiotic microorganisms. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2014;54(7):938-956.
- Caplan MS, Jilling T. Neonatal necrotizing enterocolitis: possible role of probiotic supplementation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2000;30:S18-S22.
- Guyonnet D, Chassany O, Ducrotte P, et al. Effect of a fermented milk containing *Bifidobacterium animalis* DN-173 010 on the health-related quality of life and symptoms in irritable bowel syndrome in adults in primary care: a multicentre, randomized, double-blind, controlled trial. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007;26(3):475-486.
- Wan LY, Chen ZJ, Shah NP, El-Nezami H. Modulation of intestinal epithelial defense responses by probiotic bacteria. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2016;56(16):2628-2641.
- Castro-Bravo N, Hidalgo-Cantabrana C, Rodríguez-Carvajal MA, Ruas-Madiedo P, Margolles A. Gene replacement and fluorescent labeling to study the functional role of exopolysaccharides in *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. *Front Microbiol*. 2017;8:1405.
- Fontana F, Bermudez-Brito M, Plaza-Díaz J, Muñoz-Quezada S, Gil A. Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *Br J Nutr*. 2013;109:s35-s50.
- Hernandez-Rodriguez D. Tipificación y aislamiento de una bacteria probiótica de *Alouatta pigra* silvestres para su aplicación en monos aulladores cautivos. (Master Thesis). Xalapa Veracruz: Instituto de Neuroetología, Universidad Veracruzana; 2015.

22. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2017-3. www.iucnredlist.org. Accessed March 23, 2018.
23. Gual-Sillí F, Rendón-Franco E. Primates Mexicanos en Cautiverio. In: Días PA, Negrín AR, Espinosa DC, Eds. *La Conservación de los Primates en México*. Xalapa: Gobierno del Estado de Veracruz, Consejo Veracruzano de Ciencia y Tecnología; 2011:59-77.
24. Serio-Silva JC, Olgún EJ, García-Ferri L, Tapia-Fierro K, Chapman CA. Cascading impacts of anthropogenically driven habitat loss: deforestation, flooding, and possible lead poisoning in howler monkeys (*Alouatta pigra*). *Primates*. 2015;56(1):29-35.
25. Amato KR, Yeoman CJ, Kent A, et al. Habitat degradation impacts black howler monkey (*Alouatta pigra*) gastrointestinal microbiomes. *ISME J*. 2013;7(7):1344.
26. Pastor-Nieto R. Health and welfare of howler monkeys in captivity. In: Kowallewski MM, Garber PA, Cortes-Ortiz L, Urbani B, Youlatos D. *Howler Monkeys*. New York, NY: Springer; 2015:313-355.
27. Milton K, McBee RH. Rates of fermentative digestion in the howler monkey, *Alouatta palliata* (primates: ceboidea). *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol*. 1983;74(1):29-31.
28. Marsh LK, Loiselle BA. Recruitment of blackhowler fruit trees in fragmented forests of northern Belize. *Int J Primatol*. 2003;24(1):65-86.
29. Anzai EK, Souza Júnior JC, Peruchí AR, et al. First case report of non-human primates (*Alouatta clamitans*) with the hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* serotype K1 strain ST 23: a possible emerging wildlife pathogen. *J Med Primatol*. 2017;46(6):337-342.
30. Aristizabal JF, Rothman JM, García-Ferri LM, Serio-Silva JC. Contrasting time-based and weight-based estimates of protein and energy intake of black howler monkeys (*Alouatta pigra*). *Am J Primatol*. 2017;79(4):1-8.
31. Jarquín-Díaz VH, Barbachano-Guerrero A, Maldonado-Rodríguez R, Vásquez-Aguilar AA, Aguilar-Faisal JL. First molecular evidence of *Hepatozoon canis* in domestic dogs and ticks in fragmented rain-forest areas in Mexico. *Vet Parasitol*. 2016;6:4-8.
32. Pozo-Montuy G, Serio-Silva JC, Bonilla-Sánchez YM, Bynum N, Landgrave R. Current status of the habitat and population of the black howler monkey (*Alouatta pigra*) in Balancán, Tabasco, Mexico. *Am J Primatol*. 2008;70(12):1169-1176.
33. Pozo-Montuy G, Serio-Silva JC. Movement and resource use by a group of *Alouatta pigra* in a forest fragment in Balancán, México. *Primates*. 2007;48(2):102-107.
34. García-Ferri LM, Chapman CA, Pastor-Nieto R, Serio-Silva JC. Biochemical and hematological evaluations of black howler monkeys (*Alouatta pigra*) in highly degraded landscapes in Mexico. *J Med Primatol*. 2017;46(6):304-310.
35. Fuller R. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol*. 1989;66(5):365-378.
36. Sanz Y, Collado MC, Haros M, Dalmáu J. Funciones metabólicas nutritivas de la microbiota intestinal y su modulación a través de la dieta: probióticos y prebióticos. *Acta Pediatr Esp*. 2004;62(11):520-526.
37. Bottacini F, van Sinderen D, Ventura M. Omics of bifidobacteria: research and insights into their health-promoting activities. *Biochem J*. 2017;474(24):4137-4152.
38. Nakamura N, Amato KR, Garber P, Estrada A, Mackie RI, Gaskins HR. Analysis of the hydrogenotrophic microbiota of wild and captive black howler monkeys (*Alouatta pigra*) in Palenque National Park, Mexico. *Am J Primatol*. 2011;73(9):909-919.
39. Amato KR, Leigh SR, Kent A, et al. The gut microbiota appears to compensate for seasonal diet variation in the wild black howler monkey (*Alouatta pigra*). *Microb Ecol*. 2015;69(2):434-443.
40. Amato KR, Van Belle S, Di Fiore A, et al. Patterns in gut microbiota similarity associated with degree of sociality among sex classes of a neotropical primate. *Microb Ecol*. 2017;74(1):250-258.
41. Escudero Álvarez E, González Sánchez P. La fibra dietética. *Nutr Hosp*. 2006;21:61-72.
42. Orkin JD, Campos FA, Myers MS, Cheves HSE, Guadamuz A, Melin AD. Seasonality of the gut microbiota of free-ranging white-faced capuchins in a tropical dry forest. *ISME J*. 2018. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0256-0>
43. Nomoto R, Takano S, Tanaka K, Tsujikawa Y, Kusunoki H, Osawa R. Isolation and identification of *Bifidobacterium* species from feces of captive chimpanzees. *Biosci Microbiota Food Health*. 2017;36(3):91-99.
44. Allegretti L, Revolledo L, Astolfi-Ferreira CS, et al. Isolation and molecular identification of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* spp. from faeces of the blue-fronted Amazon parrot in Brazil. *Benef Microbes*. 2014;5(4):497-503.
45. Matsuki T, Watanabe K, Tanaka R, Fukuda M, Oyaizu H. Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers. *Appl Environ Microbiol*. 1999;65(10):4506-4512.
46. Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, et al. Quantitative PCR with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers for analysis of human intestinal bifidobacteria. *Appl Environ Microbiol*. 2004;70(1):167-173.
47. Jarocki P, Podleśny M, Komoń-Janczara E, Kucharska J, Gilbowska A, Targoński Z. Comparison of various molecular methods for rapid differentiation of intestinal bifidobacteria at the species, subspecies and strain level. *BMC Microbiol*. 2016;16(1):159.
48. Akay HK, Tokman HB, Hatipoglu N, et al. The relationship between bifidobacteria and allergic asthma and/or allergic dermatitis: a prospective study of 0-3 year-old children in Turkey. *Anaerobe*. 2014;28:98-103.
49. Park MS, Kwon B, Ku S, Ji GE. The efficacy of *Bifidobacterium longum* BORI and *Lactobacillus acidophilus* AD031 probiotic treatment in infants with rotavirus infection. *Nutrients*. 2017;9(8):887.
50. Mendes E, Aceturi BG, Thomas AM, et al. Prophylactic supplementation of *Bifidobacterium longum* 51A protects mice from ovariectomy-induced exacerbated allergic airway inflammation and airway hyperresponsiveness. *Front Microbiol*. 2017;8:1732.
51. Yun B, Song M, Park DJ, Oh S. Beneficial effect of *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 on survival rate of *Clostridium difficile* infection in mice. *Korean J Food Sci Anim Resour*. 2017;37(3):368.
52. Vieira AT, Rocha VM, Tavares L, et al. Control of *Klebsiella pneumoniae* pulmonary infection and immunomodulation by oral treatment with the commensal probiotic *Bifidobacterium longum* 51A. *Microbes Infect*. 2016;18(3):180-189.
53. Hong W, Chen M. Rapid identification of bifidobacteria in dairy products by gene-targeted species-specific PCR technique and DGGE. *Asian-Aust J Anim Sci*. 2007;20(12):1887.

**How to cite this article:** Hernández-Rodríguez D, Vásquez-Aguilar AA, Serio-Silva JC, Rebollar EA, Azaola-Espinosa A. Molecular detection of *Bifidobacterium* spp. in faeces of black howler monkeys (*Alouatta pigra*). *J Med Primatol*. 2019;48: 99-105. <https://doi.org/10.1111/jmp.12395>



**B) «Éramos muchos y parió la mona»: dieta de '*Alouatta pigra*' en condiciones de fragmentación en Balancán, Tabasco. Hernández Rodríguez, D., Serio Silva, J.C. (2020). KUXULKAB', 26(54): 27-39, enero-abril. DOI: <https://doi.org/10.19136/kuxulkab.a26n54.3208>**



## «ÉRAMOS MUCHOS Y PARIÓ LA MONA»: DIETA DE *Alouatta pigra* EN CONDICIONES DE FRAGMENTACIÓN EN BALANCÁN, TABASCO

«WE WERE TOO MANY AND THE MONKEY  
GAVE BIRTH»: *Alouatta pigra* DIET IN  
FRAGMENTATION CONDITIONS IN  
BALANCÁN, TABASCO

Dolores Hernández Rodríguez<sup>1</sup> & Juan Carlos Serio Silva<sup>2,3,4</sup>

<sup>1</sup>Médica Veterinaria Zootecnista por la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM unidad Xochimilco); Maestra en Neuroetología por el Instituto de Neuroetología de la Universidad Veracruzana (UV); actualmente estudiante del Doctorado en Ciencias Agropecuarias de la UAM. Tiene interés particular en el estudio de la microbiota intestinal, nutrición y salud de diversas especies animales, especialmente aquellas con acceso limitado a recursos nutricionales como los monos aulladores en fragmentos de bosques o en condiciones de cautiverio. <sup>2</sup>Licenciado en Biología, Maestro en Ciencias en Neuroetología, Doctor en Ecología y Manejo de Recursos Naturales. Primatólogo con más de 30 años de trayectoria. Miembro del Sistema Nacional de Investigadores (SNI) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Expresidente de la Asociación Mexicana de Primatología A.C. (AMP). Recibió el Premio Estatal de Ecología «José Narciso Rovirosa» 2014, otorgado por el Gobierno del Estado de Tabasco; además, por la American Society of Primatologists fue reconocido con el Conservation Award. Actualmente investigador del Instituto de Ecología A.C. (INECOL).

Instituto de Ecología A.C. (INECOL): Carretera Antigua a Coatepec #351; Col. El Haya. C.P. 91070. Xalapa, Veracruz, México.

✉ [juan.serio@inecol.mx](mailto:juan.serio@inecol.mx)

📞 0000-0002-4479-5146 📞 0000-0002-0582-2041

### Como referenciar:

Hernández Rodríguez, D. & Serio Silva, J.C. (2020). «Éramos muchos y parió la mona»: dieta de *Alouatta pigra* en condiciones de fragmentación en Balancán, Tabasco. *Kuxulkab'*, 26(54): 27-39, enero-abril. DOI: <https://doi.org/10.19136/kuxulkab.a26n54.3208>

### Disponible en:

<http://www.revistas.ujat.mx>

<http://www.revistas.ujat.mx/index.php/kuxulkab>

DOI: <https://doi.org/10.19136/kuxulkab.a26n54.3208>

### Resumen

Los monos aulladores negros o saraguatos negros (*Alouatta pigra*) constituyen una de las tres especies de primates silvestres mexicanos. Sin embargo, a pesar de que se ha documentado su gran flexibilidad conductual para adaptarse a diferentes ambientes, se tienen evidencias del impacto que tiene la disponibilidad del alimento y características de la vegetación en el éxito del aprovechamiento del hábitat que ocupen. A fin de evaluar de qué manera esta especie se adapta y selecciona su dieta dentro de un hábitat con fragmentación extrema, se realizaron observaciones conductuales. Así se pudo conocer las especies vegetales consumidas por dos grupos de saraguatos negros en dos sitios con distintas características y limitado espacio arbóreo.

**Palabras clave:** Primates; Alimentación; Hábitat; México.

### Abstract

Black howler monkeys or black saraguatos (*Alouatta pigra*) constitute one of the three species of Mexican wild primates. However, although its great behavioral flexibility to adapt to different environments has been documented, there is evidence of the impact that food availability and vegetation characteristics have on the success of the use of the habitat they live in. In order to assess how this species adapts and selects its diet within a habitat with extreme fragmentation, behavioral observations were made. Thus, it was possible to know the plant species consumed by two groups of black saraguatos in two sites with different characteristics and limited tree space.

**Keywords:** Primates; Feeding; Habitat; Mexico.

El mono aullador negro (*Alouatta pigra*) es una de las tres especies de primates silvestres que se distribuyen en el sureste de México. Este también conocido como «saraguato», es un primate arbóreo y de hábitos diurnos que se ha caracterizado como muy selectivo en cuanto a su dieta, tanto en ambientes conservados como fragmentados (Nagy & Milton, 1979). Actualmente, está catalogado como una especie en peligro de extinción en la NOM-059-SEMARNAT-2010 (Marsh, Cuarón, Cortés-Ortiz, Shedden, Rodríguez-Luna, de Grammont, 2008), siendo la pérdida y fragmentación de su hábitat los principales factores que han contribuido a su disminución poblacional.

Siendo *A. pigra* una especie de importancia ecológica y centinela del estado de los ecosistemas (Pérez-Gil, Jaramillo, Muñoz & Torres, 1996), el estudio de sus patrones de alimentación en ambientes fragmentados resulta clave para entender sus mecanismos de adaptación y para la preservación de la especie. Para ello es básico conocer qué come, cómo selecciona su alimento y cómo se mantiene la población en territorios cada vez más pequeños.

#### ¿Qué me como y cómo me lo como siendo un mono aullador negro?

De acuerdo con sus hábitos de alimentación, los monos aulladores se clasifican como consumidores prioritarios de hojas (folívoros) y de frutos (frugívoros) de plantas silvestres dentro de su hábitat natural (Silver, Ostro, Yeager & Dierenfeld, 2000; Arayo-Rodríguez & Dias, 2010). Al respecto, diversos estudios han señalado que en los monos aulladores el tiempo dedicado a la alimentación se encuentra entre el 17 y 23 % del total de su actividad (Pozo-Montuy & Serio-Silva, 2006; Silver, Ostro, Yeager & Horwich, 1998), incluyendo periodos de descanso de alrededor del 70 % del tiempo (Pozo-Montuy & Serio-Silva, 2006; Ramírez-Julián, 2010).

Basándose en esta última característica conductual, algunos investigadores consideraron a *A. pigra* como animales letárgicos y de lento desplazamiento entre sus sitios de alimentación, sugiriendo que esto se debía al consumo de alimentos de difícil digestión y de bajo contenido energético (Stevenson, 2000). Sin embargo, investigaciones más recientes no encontraron variaciones en los patrones de descanso, aun cuando la cantidad de energía y tipo de alimentos variaba (Ramírez-Julián; Amato, Leigh, Kent, Mackie, Yeoman, Stumpf, Wilson, Nelson, White & Garber, 2014).

Asimismo, además del comportamiento alimenticio propio de la especie, sus adaptaciones anatómicas, particularmente en los sitios de fermentación dentro de su sistema digestivo (intestino anterior, ciego-colon), resultan factores trascendentales que condicionan lo que cada individuo de esta especie va a seleccionar dentro de su dieta (Hume, 2002).

Por si fuera poco, en conjunto con estas adaptaciones gastrointestinales, los monos saraguatos incluyen la presencia de microorganismos simbióticos que tienen la función de digerir la fibra vegetal (principalmente celulosa y hemicelulosa), usando enzimas que el propio mono no es capaz de producir (Holzapfel, Haberer, Geisen, Björkroth & Schillinger, 2001; Amato *et al.*, 2014).

«El estudio de la selección de recursos alimenticios y las características de la vegetación que componen el hábitat del saraguato, son factores claves para comprender las estrategias de alimentación, así como su capacidad de adaptación y supervivencia»

Es gracias a la intervención de estos microorganismos que se obtiene hasta un 36 % de los requerimientos energéticos diarios de los primates (Milton & McBee, 1983).

### Seleccionando la ensalada dentro del buffet de la selva.

Los estudios realizados con los monos aulladores de México señalan que estos se alimentan, preferentemente, de hojas jóvenes seguido por retoños y frutos maduros, y en menor proporción de frutos inmaduros, flores y tallos (Pozo-Montuy & Serio-Silva, 2006; Dias & Rangel-Negrín, 2015).

También en estudios con otras especies de *Alouatta* se ha observado que seleccionan las partes más jóvenes y menos fibrosas de las plantas, las cuales son más fáciles de digerir y tienen mayor contenido de agua (Coelho, Bramblett, Quick & Bramblett, 1976; Milton, 1980).

Aunado a lo anterior, se ha demostrado que existen variaciones en la selección de alimentos en las distintas estaciones del año, ya que en cada una de estas, se presentan de manera variable los recursos utilizados para la alimentación (Pavelka & Knopff, 2004; Pozo-Montuy & Serio-Silva, 2006; Dias & Rangel-Negrín, 2015). Estas condiciones ambientales promueven en los individuos una mayor flexibilidad en su conducta alimenticia, tratando de maximizar sus beneficios nutricionales aun en condiciones de baja disponibilidad de recursos (Estrada & Coates-Estrada, 1996).

En cuanto a las especies consumidas por *Alouatta*, autores como Dias & Rangel-Negrín (2015), reportan principalmente cuatro familias y alrededor de 413 spp. (*Fabaceae* 200 spp.), *Moraceae* (104 spp.), *Sapotaceae* (56 spp.), y *Bignoneaceae* (53 spp.), quienes juntas, representan el 35 % de las especies reportadas para la alimentación de estos monos en todo su rango de distribución en el neotrópico.

### Y la familia crece, pero el hábitat disminuye: ¿cómo resolver esto siendo saraguato?

El ámbito hogareño del mono aullador negro varía considerablemente de acuerdo a la región (Gavazzi, Cornick, Markowitz, Green & Markowitz, 2008) y puede extenderse desde 10 (Ostro, Silver, Koontz, Young & Horwich, 1999) hasta las 125 hectáreas (Schlichte, 1978; Caywood, Cunningham & Cant, 1979) en condiciones óptimas.

Sin embargo, dadas las condiciones de pérdida de hábitat a las que se enfrentan actualmente, estos grupos de primates

mexicanos han tenido que intentar sobrevivir en áreas más pequeñas y adaptarse a las condiciones del paisaje para aprovechar de manera eficiente los recursos alimenticios disponibles (Chapman, 1990; Pozo-Montuy & Serio-Silva, 2006).

Ante tal escenario, se ha demostrado que los cambios antrópicos que transforman bosques continuos en fragmentos, afectan la disponibilidad de recursos alimentarios. A medida que los fragmentos se vuelven más pequeños, de forma más irregular y más aislados, se impacta de manera directa a su composición vegetal, diversidad de especies de plantas y estructura de la vegetación (Laurance, Ferreira, Rankin-de Meroza, Laurance, Hutchings & Lovejoy, 1998; Laurance, Delamônica, Laurance, Vasconcelos & Lovejoy, 2000; Hill & Curran, 2003); lo que podría reducir no solo la cantidad, sino también la calidad de los recursos alimenticios para los primates (Arroyo-Rodríguez & Mandujano, 2006; Arroyo-Rodríguez & Dias, 2010).

Otro aspecto por demás importante a considerar es, el efecto de la fragmentación sobre el microclima dentro y alrededor de los parches resultantes, causando aumento de radiación, temperatura y viento, así como disminución de la humedad (Saunders, Hobbs & Margules, 1991; Aristizabal, Lévêque, Chapman & Serio-Silva, 2018).

Estos efectos a su vez, producen cambios en la composición y estructura de la vegetación y que conlleva a un aumento en la tasa de mortalidad de árboles y, por lo tanto, pérdida de biomasa arbórea nativa que es utilizada por los monos en su alimentación (Arroyo-Rodríguez & Mandujano, 2006).

Con base en lo anterior, creemos que el estudio de la selección de recursos alimenticios y las características de la vegetación que componen su hábitat, además de la fisiología propia del organismo, resultan factores clave para entender las estrategias de alimentación de los monos aulladores y, con ello, su capacidad de adaptación ante la falta o disminución de recursos, así como para la supervivencia de dicha especie.

Esta investigación desea contribuir a incrementar este conocimiento, caracterizando la respuesta de los monos aulladores a condiciones extremas de fragmentación en una región del municipio de Balancán, Tabasco.

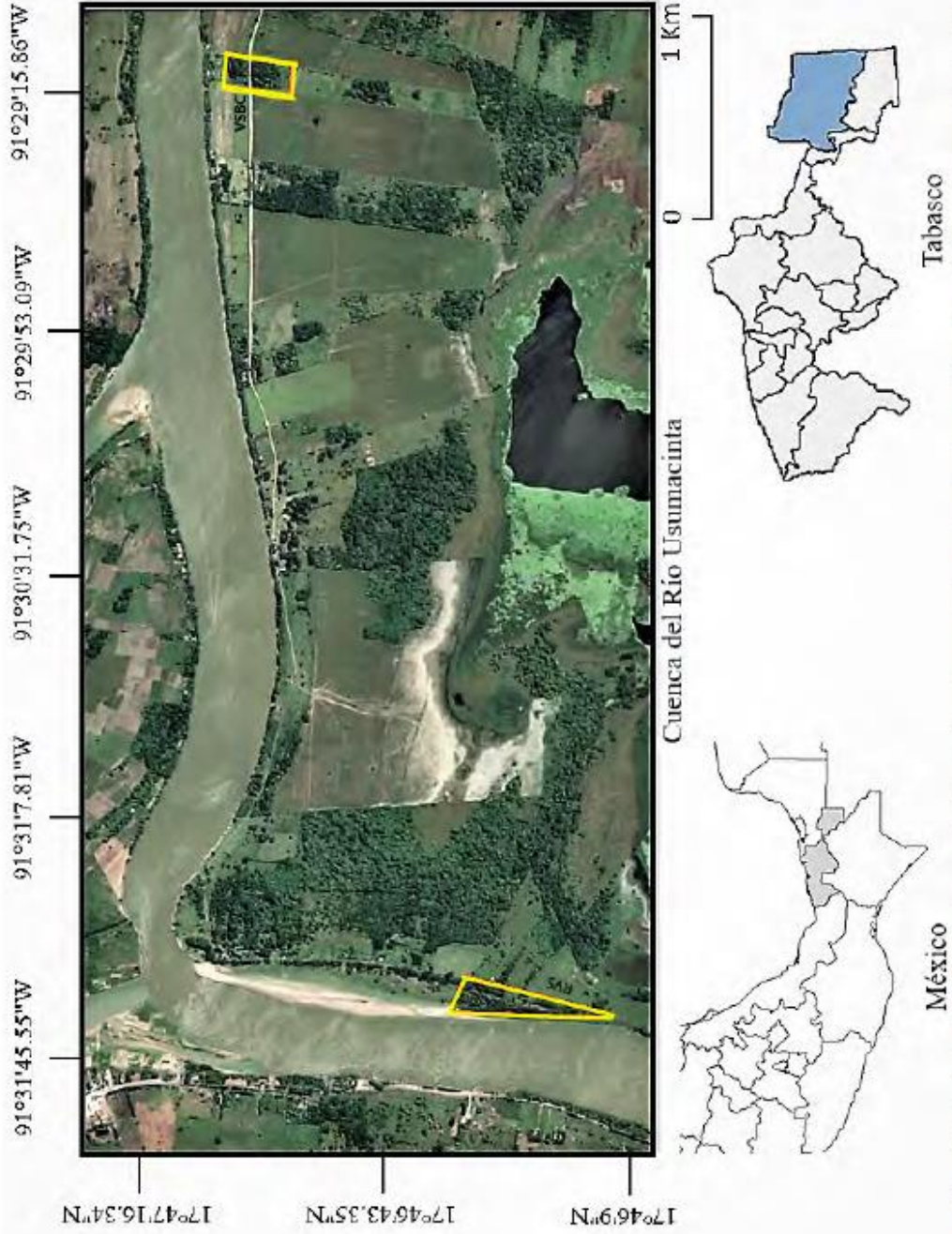


Figura 1. Mapa del sitio de estudio; se muestra la superficie del sitio de trabajo con los fragmentos de selva estudiados delimitados en contorno amarillo. En el ángulo inferior izquierdo se observa el sitio RV5 y en el ángulo superior derecho se encuentra el sitio VSB.

### ¿Cómo lo hicimos?

#### Sitio de estudio y caracterización del espacio arbóreo.

El presente estudio se realizó entre marzo de 2016 y enero de 2017, en dos sitios con distintas características de vegetación en una región de Balancán, Tabasco, México (17° 46' 30.51" N, 91° 29' 49.31" W) a 10 metros sobre el nivel del mar (msnm); (figura 1).

La región muestra un clima predominantemente cálido subhúmedo con lluvias en verano y una temperatura anual promedio de 26.3 °C y está marcado por tres temporadas climáticas: lluvias, que comprende el periodo de mayo a octubre; nortes, de noviembre a enero; y secas, que abarca de febrero a abril (Pozo-Montuy & Serio-Silva, 2006; INEGI, 2016).

El primer sitio se catalogó como un fragmento ripario con vegetación secundaria (RVS), que se compone por una diversidad de árboles y arbustos que bordean una sección del río Usumacinta. Dicho fragmento se encuentra modificado por actividades antrópicas como la ganadería y asentamientos para vivienda. Presenta tanto vegetación nativa, como introducida por el hombre, además, registra alto potencial de inundación sobre todo en los meses de mayo a octubre, que corresponde a la temporada de lluvias.

El segundo sitio es un remanente de selva que se encuentra rodeado por cultivos agrícolas. Se ha catalogado como de vegetación secundaria bajo conservación (VSBC), se ubica en un terreno más alto, sin registros históricos de inundación y sin presencia evidente de fauna doméstica.

Para cada fragmento se realizaron tres transectos de 10 metros para identificar las especies de árboles presentes en cada sitio. A fin de catalogar los árboles utilizados en la alimentación, se consideraron algunas características reportadas en el trabajo de Sánchez-Garzón (2016), que incluyen el diámetro a la altura del pecho (DAP) y el diámetro de la copa en sus dimensiones polar y ecuatorial.

Con base en esta información se consideraron las categorías de diámetro de copa como: a) pequeño (diámetro entre 11.9 y menor a 12.9 metros); b) mediano (entre 13 a 14.9 metros); y c) grande (mayor a 15 metros).

**Sujetos de estudio y método observacional de la conducta.** Se trabajó con individuos de diferente clase sexo-edad en dos grupos de '*A. pigra*', ubicados cada uno de ellos en dos fragmentos de selva de la rancharía Josefa Ortiz de Domínguez, en Balancán Tabasco (tabla 1).

**Tabla 1.** Composición de los grupos en cada zona.

Sitio	Composición: sexo -edad	No. Individuos
RVS	MA	2
RVS	HA	3
RVS	MJ	2
RVS	HJ	1
RVS	I	2
VSBC	MA	1
VSBC	HA	2
VSBC	HJ	2
VSBC	MJ	1

RVS= Ripario con vegetación secundaria; VSBC= Vegetación secundaria bajo conservación; MA= Macho adulto; HA= Hembra adulta; MJ= Macho juvenil; HJ= Hembra juvenil; I= Infante.

Durante los periodos de muestreo se realizaron observaciones con el fin de obtener datos de los hábitos de alimentación; se registró la frecuencia, especie y parte vegetal (hoja, flor o fruta) consumida. Los registros de alimentación se realizaron por medio de observación mediante el método «Animal focal» durante 60 minutos para cada individuo (Amato, Yeoman, Kent, Righini, Carbonero, Estrada, Gaskins, Stumpf, Yildirim, Torralba, Gillis, Wilson, Nelson, White & Leigh, 2013).

#### Registro de los periodos dedicados a la alimentación.

Se observaron y registraron las especies de árboles utilizadas por los monos para la alimentación con el fin de identificar las preferencias en cada época del año. Con base en reportes anteriores realizados en el mismo sitio, se consideraron las frecuencias de alimentación y la selección de partes vegetales (Aristizabal, 2013; Sánchez-Garzón, 2016).

Las fases fenológicas se clasificaron como: hojas maduras (hm), hojas jóvenes (hj), flores (fl), frutos maduros (fm) y frutos inmaduros (fi); ayudando con ello a identificar de manera más específica la selección de alimento por los monos.

**Tabla 2.** Especies arbóreas registradas y sus características.

Sitio	Nombre común	Nombre científico	DAP cm (mín-max)	DAP cm (promedio)	DDC
RVS	Guano	<i>Sabal mexicana</i>	80	80	Pequeña
RVS	Gusano	<i>Lonchocarpus guatemalensis</i>	68-90	79	Grande
RVS	Rabo de perro	<i>Tabernaemontana chrysoarpa</i>	20	20	Pequeña
RVS	Tucuy	<i>Pithecellobium lanceolatum</i>	146-60	153	Grande
RVS	Pucte	<i>Bucida buceras</i>	116-130	126	Grande
RVS	Vicks	<i>Inga edulis</i>	60-82	71	Mediana
RVS	Guésimo	<i>Guazuma ulmifolia</i>	59-62	60	Mediana
RVS	Cafetillo	<i>Casearia sylvestris</i>	40	40	Mediana
RVS	Pepino Kat	<i>Parmentiera aculeata</i>	30	30	Mediana
RVS	Maculí	<i>Tabebuia rosea</i>	118	118	Mediana
RVS	Guayabo	<i>Psidium guajava</i>	119	119	Pequeña
RVS	Tinto	<i>Haematoxylum campechianum</i> L.	60	60	Mediana
RVS	Caracolillo	<i>Albizia leucocalyx</i>	78-100	98	Grande
RVS	Cedrillo	<i>Phyllanthus salvifolius</i>	28	28	Mediana
RVS	Cantemoc	<i>Lysiloma cf. microphyllum</i>	100-118	110	Grande
RVS	Moral	<i>Maclura tinctoria</i>	79	79	Grande
VSBC	Guésimo	<i>Guazuma ulmifolia</i>	76-120	111	Grande
VSBC	Guano	<i>Sabal mexicana</i>	80	80	Pequeña
VSBC	Caracolillo	<i>Albizia leucocalyx</i>	100-130	115	Grande
VSBC	Rabo de perro	<i>Tabernaemontana chrysoarpa</i>	22	22	Pequeña
VSBC	Guayabo	<i>Psidium guajava</i>	73	73	Pequeña
VSBC	Tucuy	<i>Pithecellobium dulce</i>	80-100	90	Grande
VSBC	Maculí	<i>Tabebuia rosea</i>	100	100	Mediana
VSBC	Capulín	<i>M. calabura</i> L.	20	20	Pequeña

DAP= diámetro a la altura de pecho mínima y máxima (mín-máx); DDC= diámetro de copa en sus dimensiones polar y ecuatorial, se considera como pequeño aquellos con diámetro mayor a 119 centímetros y menor a 129 centímetros, mediano de 130 a 149 centímetros y grande mayor a 150 centímetros (Sánchez-Garzón, 2016).

KUKULKAB' Revista de divulgación científica de la División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco

**Resultados**

**Disponibilidad de la dieta para los monos en el hábitat fragmentado.** En el sitio RVS se encontraron dieciséis especies de árboles y en la zona VSBC se observó una diversidad de ocho especies de árboles. De las dieciséis especies de árboles encontradas en el fragmento RVS, la predominante fue el conocido como «tucuy» (*Pithecellobium lanceolatum*) con trece individuos registrados; mientras que en la zona VSBC el «caracolillo» (*Albizia leucocalyx*) fue predominante con diez individuos; seguido por el árbol llamado «gusano» (*Lonchocarpus guatemalensis*) con nueve individuos (tabla 2).

Tabla 3. Frecuencia de alimentación por especie.

Sitio	Especie consumida (nombre científico)	Especie consumida (nombre común)	Frecuencia/Temporadas			Total
			Secas	Lluvias	Nortes	
RVS	<i>Albizia leucocalyx</i>	Caracolillo	1	4	5	10
RVS	<i>Ficus sp1</i>	Higuera	1	1	-	2
RVS	<i>Guazuma ulmifolia</i>	Guásimo	1	1	2	4
RVS	<i>Haemataxylon campechianum</i>	Tinto	2	2	2	6
RVS	<i>Inga edulis</i>	Vicks	3	-	3	6
RVS	<i>Lysiloma cf. microphyllum</i>	Cantemac	3	1	3	7
RVS	<i>Machaerium sp.</i>	—	3	-	-	3
RVS	<i>Malvaviscus cf. arboreus</i>	Chocho	1	-	1	2
RVS	<i>Pithecellobium lanceolatum</i>	Tucuy	8	9	8	23
RVS	<i>Psidium guajava</i>	Guayabo	1	4	-	5
RVS	<i>Sabal mexicana</i>	Guano	-	3	4	7
RVS	<i>Tabebuia rosea</i>	Maculí	-	2	2	4
VSBC	<i>Albizia leucocalyx</i>	Caracolillo	9	6	8	23
VSBC	<i>Guazuma ulmifolia</i>	Guasimo	6	2	5	13
VSBC	<i>Pithecellobium lanceolatum</i>	Tucuy	-	4	2	6
VSBC	<i>Tabebuia rosea</i>	Maculí	4	5	2	11
VSBC	<i>Muntingia calabura</i>	Capulín	2	1	-	3
VSBC	<i>Maclura Tinctoria</i>	Moral	-	3	-	3

**Selección y consumo bajo condiciones de fragmentación extrema.** Derivado de las horas de observación acumuladas durante las tres temporadas (n=144 h) se obtuvieron datos de alimentación que muestran que los grupos de monos en ambos sitios procuraron su dieta a partir de 18 especies de árboles en total, y estas se distribuyeron en 12 para el fragmento de RVS y seis para el de VSBC. Particularmente, en el sitio RVS la especie preferida fue el '*Pithecellobium lanceolatum*', mientras que para el sitio de VSBC. La especie de árbol en el que observaron más eventos de alimentación fue '*Albizia leucocalyx*', estas dos especies fueron en las que registraron más eventos de alimentación durante las tres temporadas.

Se pudo observar que, durante la temporada de lluvias, la elección de especies de árboles para la alimentación se dirigió a aquellos que brindan frutos succulentos como '*Psidium guajava*' en el sitio RVS, '*Tabebuia rosea*' en la zona VSBC y '*Albizia leucocalyx*' y '*Pithecellobium lanceolatum*' en ambos sitios (tabla 3).

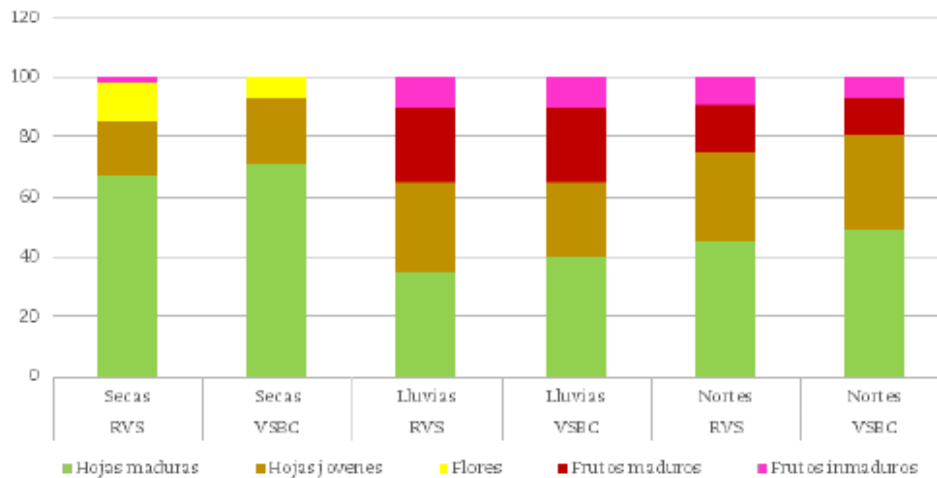
Al considerar las características morfológicas de los árboles utilizados por los monos aulladores para alimentarse, no se observó una relación clara entre las dimensiones del árbol y la preferencia para la alimentación (tabla 4). Por lo tanto, podría inferirse que esta variable no es determinante para su selección, sino más bien los recursos alimenticios proporcionados por la especie arborea.



**Tabla 4.** Relación entre especie consumida y sus características.

Especie consumida (nombre científico)	Especie consumida (nombre común)	Frecuencia total	DAP cm (promedio)	DDC
<i>Albizia leucocalyx</i>	Caracolillo	33	98	Grande
<i>Pithecellobium lanceolatum</i>	Tucuy	23	153	Grande
<i>Guazuma ulmifolia</i>	Guásimo	17	111	Grande
<i>Tabebuia rosea</i>	Maculí	15	100	Mediana
<i>Lysiloma cf. microphyllum</i>	Cantemoc	7	110	Grande
<i>Sabal mexicana</i>	Guano	7	80	Pequeña
<i>Haematoxylon campechianum</i>	Tinto	6	60	Mediana
<i>Inga edulis</i>	Vicks	6	71	Mediana
<i>Pithecellobium lanceolatum</i>	Tucuy	6	90	Grande
<i>Psidium guajava</i>	Guayabo	5	119	Pequeña
<i>Muntingia calabura</i>	Capulín	3	20	Pequeña
<i>Maclura tinctoria</i>	Moral	3	79	Grande

KUKULKA  
Revista de divulgación científica de la División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco



**Gráfica 1.** Partes vegetales que constituyeron la dieta de los monos aulladores negros en cada temporada.

En cuanto a las partes vegetales que constituyeron su dieta, los datos indican que los monos dedicaron más tiempo a consumir hojas en ambos sitios. Las hojas maduras fueron las más representativas en ambos sitios y durante las tres temporadas, sumando en conjunto un 51 % seguidas de un 26 % de hojas jóvenes, seguida de frutos maduros con 12 % e inmaduros con 6 % y por último flores con 3 % en el total de elementos que constituyeron su dieta (gráfica 1).

Cuando hacemos un análisis de la selección que hicieron los monos aulladores de cada parte vegetal entre las temporadas y sitios, observamos que durante la época de secas en el sitio RVS el consumo de hojas fue de 85 % (67 % hm y 18 % hj), mientras que para el sitio VSBC fue de 93 % (71 % hm y 22 % hj); el consumo de flores solamente se observó en esta temporada de secas y fue de 13 % para el sitio RVS y 7 % para el sitio VSBC. El consumo de frutos solo se dio en un 2 % en el sitio RVS y no se observó consumo de estos en el sitio VSBC.

Para la temporada de lluvias encontramos que las hojas representaron el 65 % del consumo en ambos sitios, la proporción de hojas maduras y jóvenes fue de 35 % y 30 % respectivamente para RVS y 40 % hm por 25 % hj para la región VSBC. El consumo de frutos mostró un importante aumento respecto a la temporada anterior abarcando un 35 % para cada sitio y la misma proporción de 25 % fm y 10 % fi. En el muestreo durante la temporada de nortes, el consumo de hojas fue de 75 % (45 % hm y 30 % hj) para el sitio RVS y 80 % (48 % hm y 32 % hj). Para VSBC, en esta época se observó un consumo menor de frutos, representado por el 25 % (16 % fm y 9 % fi) en la región RVS y 19 % (12 % fm y 7 % fi) en el segundo sitio VSBC.

### Discusión

**Monos aulladores de Balancán: de «hábitat pobre y de familia numerosa».** Evaluando las características de estructura y diversidad del hábitat disponible para los monos aulladores en una zona de fragmentación extrema, nuestros registros reflejan variaciones en cuanto a la oferta de especies y partes vegetales para cada temporada, al interior de estos paisajes naturales (Amato, Leigh, Kent, Mackie, Yeoman, Stumpf, Wilson, Nelson, White & Garber, 2015). Las variaciones de oferta y disponibilidad en el tiempo y el espacio, condicionan a cierta incertidumbre sobre la presencia de frutos, floraciones y disponibilidad de hojas. Esta condición va a promover que los monos aulladores sean mucho más selectivos, aun cuando tengan poca disponibilidad de alimento y con ello la dieta se va a modificar en cada estación.

Dichas variaciones ya han sido documentadas para la especie en estudios anteriores, aunque es muy probable que nunca en condiciones tan extremas de superficie de hábitat y disponibilidad de recursos alimenticios (Nakamura, Amato, Garber, Estrada, Mackie & Gaskins, 2011; Aristizabal, 2013; Amato *et al.*, 2015).

En el caso de los primates su presencia dentro de un fragmento se ha asociado también con las características de la vegetación (Estrada & Coates-Estrada 1996; Cristóbal-Azkarate & Arroyo-Rodríguez, 2007), pues se han correlacionado algunas características importantes de la vegetación, las cuales difieren significativamente entre fragmentos habitados y no habitados por monos.

Lo anterior ha sido reportado en el trabajo realizado por Arroyo-Rodríguez, Mandujano, Benítez-Malvido & Cuende-Fanton (2007), donde se encontró que aquellos fragmentos con mayor cantidad de árboles grandes (diámetro a la altura del pecho mayor a 60 cm) y de mayor área basal, son los que se encuentran ocupados por los monos aulladores de manto (*Alouatta palliata mexicana*), una especie emparentada que también se distribuye en México.

Con base en los hallazgos obtenidos en el presente estudio, no se encuentra una clara relación entre las características de tamaño de los árboles y la preferencia para la alimentación. Por tal motivo se podría sugerir que esta no es una característica que influya en los monos aulladores de nuestro estudio y que la selección de alimentos está más claramente influenciada por la disponibilidad de recursos (hojas, flores y frutos). Sin embargo, un estudio más amplio con un adecuado análisis estadístico puede revelar una aproximación más acertada.

**¡A comer, beber, bailar y gozar... que el fragmento de selva se va a acabar!** Esta investigación comprueba, aún bajo las circunstancias de disminución de hábitat y disponibilidad de recursos, las aseveraciones previas de algunos autores, quienes estudiando a los monos aulladores en otras condiciones indican una correlación negativa entre la ingesta de nutrientes que proveen energía y el tiempo de descanso de los monos aulladores.

Particularmente en el tiempo de descanso se ha sugerido un efecto del promedio de temperaturas máximas diarias, lo que sugiere que la microbiota intestinal puede estar contribuyendo a equilibrar los nutrientes cuando las condiciones en la disponibilidad de alimentos y en la dieta cambian (Amato *et al.*, 2015).

De manera similar a lo reportado en otros estudios realizados con el mono aullador negro (Dias & Rangel-Negrín, 2015; Sánchez-Garzón, 2016), se observó que, en la temporada de lluvias, en donde había más disponibilidad de frutos maduros e inmaduros, éstos fueron más frecuentemente elegidos por los primates.

Incluso en muestras de heces colectadas para otro estudio sobre microbiota de la especie (Hernández-Rodríguez, Vázquez-Aguilar, Serio-Silva, Rebollar & Azaola-Espinosa, 2019) se pudo observar de manera evidente la presencia de semillas de los frutos consumidos. Los monos juveniles fueron los que consumieron mayor cantidad de frutos, prefiriendo particularmente aquellos que presentaban arilos dulces y carnosos, como los frutos del Tucuy (*Pithecellobium lanceolatum*).

Al respecto, algunos autores han sugerido que existen diferencias en la selección de la dieta entre individuos y que están relacionadas con sus diferentes etapas del desarrollo. Esto debido principalmente a las necesidades fisiológicas específicas y a las habilidades físicas para acceder a los recursos o evitar a los depredadores (Pires, Guimarães Jr, Araújo, Giaretta, Costa & Dos Reis, 2011; Sánchez-Garzón, 2016). Sin embargo, otros estudios muestran una tendencia general de todos los individuos hacia un mayor consumo de hojas jóvenes, que ofrecen alto contenido proteico en relación con la cantidad de fibra, además de poca o nula presencia de taninos (Chapman & Chapman, 2002; Aristizabal, 2013).

En el caso de este estudio siempre se observó que el consumo de hojas maduras fue mayor (fotografía 1), esto puede deberse a que los estudios mencionados representan un periodo de observación más amplio.

La selección de alimentos mostró variaciones en cada temporada, de tal manera que, en temporada de lluvias, incrementó el consumo de frutos y en nortes el de flores, aunque siempre las hojas fueron el alimento más representativo. Estos datos concuerdan con lo reportado en esta zona por otros autores, cuyas observaciones reflejan una dieta mayormente folívora con variaciones temporales relacionadas con la disponibilidad de recursos (Pozo-Montuy & Serio-Silva, 2006; Aristizabal, 2013).

Los hallazgos de esta investigación también apoyan la aseveración de que los monos aulladores tienen preferencia por los frutos y los consumirán siempre que estén disponibles, mientras que el consumo de hojas será mayor ante la ausencia o escasez de frutos (Stevenson,



Fotografía 1. Macho adulto de mono aullador negro o saraguato negro (*Alouatta pigra*) consumiendo hojas maduras en Balancán, Tabasco, México.

2000). Otras investigaciones proponen que la selección de alimentos de los monos está regulada para satisfacer los requerimientos nutricionales, pero minimizando el consumo de metabolitos secundarios y fibras de difícil digestión (Nagy & Milton, 1979; Milton, 1980).

Bajo este argumento, se ha descrito que la disponibilidad de recursos alimenticios desempeña un papel fundamental para el establecimiento de las especies animales en los distintos hábitats (Worman & Chapman, 2005; Anzures-Dadda & Manson, 2007).

Asimismo, se ha mencionado que en los hábitats perturbados predomina la vegetación secundaria joven, dominada por enredaderas adaptadas a la perturbación, así como especies introducidas.

Esto puede ocasionar una disminución de árboles nativos, enfrentando a los primates a un hábitat de tamaño reducido, altamente aislados de otros remanentes de hábitat, con pocos árboles emergentes y dominados por vegetación secundaria, lo que puede mermar su sobrevivencia (Laurance *et al.*, 2000; Fuchs, Lobo & Quesada, 2003).

En el presente estudio se tiene un sitio altamente perturbado (RVS) con vegetación secundaria y especies introducidas; sin embargo, los resultados no difieren mucho a los mostrados en el segundo sitio VSBC, probablemente se deba a que muchas de las especies introducidas pueden ser aprovechadas por los monos para su alimentación. Inclusive algunas de ellas, al ser especies frutales de uso por los pobladores locales (como son árboles de guayaba, mango y ficus), proveen una mayor proporción de este recurso para los monos que habitan ahí.

Particularmente, consideramos que es importante este tipo de estudios, pues es vital conocer las flexibilidades, conductuales y ecológicas que poseen los primates para alimentarse de vegetación secundaria o en ambientes muy perturbados, lo cual va a determinar su capacidad de sobrevivir en pequeños fragmentos (Gilbert, 2003).

### Conclusiones

Durante la realización de este estudio pudimos conocer algunas de las características de la alimentación de los monos aulladores negros en dos zonas con alto grado de perturbación.

No se apreciaron grandes diferencias en la selección de alimentos por los monos aulladores entre los dos sitios, a pesar de presentar contrastes de estructura de la vegetación y su diversidad de especies. Pudimos observar que, la selección de alimentos, está claramente relacionada con la disponibilidad de estos que ofrece cada hábitat, y que las características morfológicas de los árboles no son un factor determinante en dicha selección.

Futuros estudios, pueden, abarcar un mayor tiempo de muestreo e incluir otros sitios para comparar si existe un patrón similar en la alimentación en cada temporada; también se pueden analizar las características de los sitios que habitan los monos y compararlos con otros sitios no habitados; esto para conocer los factores que determinan la presencia de los monos y trabajar en conservarlos e, incluso, adaptarlos a otros sitios con potencial para ser habitados por los monos y de esta manera brindarles mayores espacios para habitar.

### Agradecimientos

Agradecemos a la Estación de Investigación Primatológica y de Vida Silvestre en Balancán (Tabasco) por las facilidades de alojamiento y servicios. A Dolores Tejero y Antonio A. Vázquez por su apoyo en campo. A Natalí Ximena Sánchez Garzón, por su apoyo en la colecta de datos, asesoría en la identificación de especies arbóreas y las recomendaciones en el uso de las fenofases.

### Referencias

- Amato, K.R.; Leigh, S.R.; Kent, A.; Mackie, R.I.; Yeoman, C.J.; Stumpf, R.M.; Wilson, B.A.; Nelson, K.E. White, B.A. & Garber, P.A. (2014). The role of gut microbes in satisfying the nutritional demands of adult and juvenile wild, black howler monkeys (*Alouatta pigra*). *American Journal of Physical Anthropology*, (155): 652-664. DOI «<https://doi.org/10.1002/ajpa.22621>»
- Amato, K.R.; Leigh, S.R.; Kent, A.; Mackie, R.I.; Yeoman, C.J.; Stumpf, R.M.; Wilson, B.A.; Nelson, A.; White, B.A. & Garber, P.A. (2015). The gut microbiota appears to compensate for seasonal diet variation in the wild black howler monkey (*Alouatta pigra*). *Microbial Ecology*, (69): 434-443. DOI «<https://doi.org/10.1007/s00248-014-0554-7>»
- Amato, K.R.; Yeoman, C.J.; Kent, A.; Righini, N.; Carbonero, F.; Estrada, A.; Gaskins, H.; Stumpf, R.M.; Yildirim, S.; Torralba, M.; Gillis, M.; Wilson, B.A.; Nelson, K.E., White, B.A. & Leigh, S.R. (2013). Habitat degradation impacts black howler monkey (*Alouatta pigra*) gastrointestinal microbiomes. *The International Society for Microbial Ecology Journal (ISMEJ)*, (7): 1344-1353. Recovered from «<https://www.nature.com/articles/ismej201316.pdf>»
- Anzures-Dadda, A. & Manson, R.H. (2007). Patch- and landscape-scale effects on howler monkey distribution and abundance in rainforest fragments. *Animal Conservation*, (10): 69-76. DOI «<https://doi.org/10.1111/j.1469-1795.2006.00074.x>»

**Aristizabal, J.F.** (2013). *Estrategias de forrajeo y características nutricionales de la dieta del mono aullador negro ('Alouatta pigra') en un ambiente fragmentado*. (Tesis de Maestría en Ciencias, publicada). Xalapa, Veracruz, México: Instituto de Ecología A.C. (INECOL).

**Aristizabal, J.F.; Lévêque, L.; Chapman, C.A. & Serio-Silva, J.C.** (2018). Impacts of temperature on behaviour of the mexican endangered black howler monkey '*Alouatta pigra*' Lawrence, 1933 (Primates: Atelidae) in a fragmented landscape. *Acta Zoológica Bulgarica*, 70(3): 377-382. Recovered from «<http://www.acta-zoologica-bulgarica.eu/downloads/acta-zoologica-bulgarica/2018/70-3-377-382.pdf>»

**Arroyo-Rodríguez, V. & Dias, P.A.D.** (2010). Effects of habitat fragmentation and disturbance on howler monkeys: a review. *American Journal of Primatology*, 72): 1-16. DOI «<https://doi.org/10.1002/ajp.20753>»

**Arroyo-Rodríguez, V. & Mandujano, S.** (2006). Forest fragmentation modifies habitat quality for '*Alouatta palliata*'. *International Journal of Primatology*, 27(4): 1079-1096. DOI «<https://doi.org/10.1007/s10764-006-9061-0>»

**Arroyo-Rodríguez, V.; Mandujano, S.; Benítez-Malvido, J. & Cuende-Fanton, C.** (2007). The influence of large tree density on howler monkey ('*Alouatta palliata mexicana*') presence in very small rain forest fragments. *Biotropica*, 39(6): 760-766. DOI «<https://doi.org/10.1111/j.1744-7429.2007.00330.x>»

**Chapman, C.A. & Chapman, L.J.** (2002). Foraging challenges of red colobus monkeys: influence of nutrients and secondary compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 133(3): 861-875. DOI «[https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(02\)00209-X](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(02)00209-X)»

**Caywood, J.; Cunningham, T. & Cant, J.G.H.** (1979). Ecology and behavior of howler monkeys ('*Alouatta pigra*') at Tikal, Guatemala. *American Journal of Physical Anthropology*, 50(3): 426. Recovered from «<https://eurekamag.com/research/028/147/028147944.php>»

**Chapman, C.A.** (1990). Ecological constraints on group size in three species of neotropical primates. *Folia Primatologica*, 55): 1-9. DOI «<https://doi.org/10.1159/000156492>»

**Coelho, A.M.; Bramblett, C.A.; Quick, L.B. & Bramblett, S.S.** (1976). Resource availability and population density in primates: a socio-bioenergetic analysis of the energy budgets of Guatemalan howler and spider monkeys. *Primates*, 17(1): 63-80. DOI «<https://doi.org/10.1007/BF02381567>»

**Cristóbal-Azkarate, J. & Arroyo-Rodríguez, V.** (2007). Diet and activity pattern of howler monkeys ('*Alouatta palliata*') in Los Tuxtlas, Mexico: effects of habitat fragmentation and implications for conservation. *American Journal Primatology*, 69(9): 1013-1029. DOI «<https://doi.org/10.1002/ajp.20420>»

**Dias, P.A.D. & Rangel-Negrin, A.** (2015). Diets of howler monkeys. In: Kowalewski, M.; Garber, P.; Cortés-Ortiz, L.; Urbani, B. & Youlatos, D. (eds); *Howler monkeys: behavior, ecology and conservation*, (pp. 21-56). New York, NY; USA: Springer. DOI «[https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1960-4\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1960-4_2)»

**Estrada, A. & Coates-Estrada, R.** (1996). Tropical rain forest fragmentation and wild populations of primates at Los Tuxtlas, México. *International Journal of Primatology*, 17(5): 759-783. Recovered from «<https://www.uv.mx/personal/tcarmona/files/2010/08/estrada-y-coates-1996.pdf>»

**Fuchs, E.J.; Lobo, J.A. & Quesada, M.** (2003). Effects of forest fragmentation and flowering phenology on the reproductive success and mating patterns on the tropical dry forest tree '*Pachira quinata*'. *Conservation Biology*, 17(1): 149-157. DOI «<https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2003.01140.x>»

**Gavazzi, A.J.; Cornick, L.A.; Markowitz, T.M.; Green, D. & Markowitz, H.** (2008). Density, distribution, and home range of the black howler monkey ('*Alouatta pigra*') at Lamanai, Belize. *Journal of Mammalogy*, 89(5): 1105-1112. DOI «<https://doi.org/10.1644/07-MAMM-A-063.1>»

**Gilbert, K.A.** (2003). Primates and fragmentation of the Amazon forest. In: Marsh, L.K. (ed.); *Primates in fragments: ecology and conservation*, (pp. 145-147). New York, NY.; USA: Kluwer Academic/Plenum Press.

**Hernández-Rodríguez, D.; Vásquez-Aguilar, A.A.; Serio-Silva, J.C.; Rebollar, E.A. & Azaola-Espinosa, A.** (2019). Molecular detection of '*Bifidobacterium* spp.' in faeces of black howler monkeys ('*Alouatta pigra*'). *Journal of Medical Primatology*, 48(2): 99-105. DOI «<https://doi.org/10.1111/jmp.12395>»

**Hill, J.L. & Curran, P.J.** (2003). Area, shape and isolation of tropical forest fragments: effects on tree species diversity and implications for conservation. *Journal of Biogeography*, 30(9): 1391-1403. DOI «<https://doi.org/10.1046/j.1365-2699.2003.00930.x>»

**Holzappel, W.H.; Haberer, P.; Geisen, R.; Björkroth, J. & Schillinger, U.** (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2): 365s-373s. DOI «<https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.365s>»

**Hume, I.D.** (2002). Digestive strategies of mammals. *Acta Zoologica Sinica*, 48(1): 1-19. Recovered from «<https://pdfs.semanticscholar.org/d516/b8b47acbc5b29ef6dba2c51cd9b611255265.pdf>»

**INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía).** (2016). *Anuario estadístico y geográfico de Tabasco*, (p. 461). Aguascalientes, Aguascalientes; México: Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI); Gobierno del Estado de Tabasco. Recuperado de «[http://internet.contenidos.inegi.org.mx/contenidos/Productos/prod\\_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/nueva\\_estruc/anuarios\\_2016/702825084363.pdf](http://internet.contenidos.inegi.org.mx/contenidos/Productos/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/nueva_estruc/anuarios_2016/702825084363.pdf)»

- Laurance, W.F.; Delamónica, P.; Laurance, S.G.; Vasconcelos, H.L. & Lovejoy, T.E.** (2000). Rainforest fragmentation kills big trees. *Nature*, 404: 836. DOI «<https://doi.org/10.1038/35009032>»
- Laurance, W.F.; Ferreira, L.V.; Rankin-de Merona, J.M.; Laurance, S.G.; Hutchings, R.W. & Lovejoy, T.E.** (1998). Effects of forest fragmentation on recruitment patterns in Amazonian tree communities. *Conservation Biology*, 12(2): 460-464. DOI «<https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.1998.97175.x>»
- Marsh, L.K.; Cuarón, A.D.; Cortés-Ortiz, L.; Shedden, A.; Rodríguez-Luna, E. & de Grammont, P.C.** (2008). *Alouatta pigra*, The IUCN Red List of Threatened Species 2008. United Kingdom: International Union for Conservation of Nature (IUCN). DOI «<https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T914A13094441.en>»
- Milton, K. & McBee, R.H.** (1983). Rates of fermentative digestion in the howler monkey, *Alouatta palliata* (Primates: Ceboidea). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Physiology*, 74(1): 29-31. DOI «[https://doi.org/10.1016/0300-9629\(83\)90706-5](https://doi.org/10.1016/0300-9629(83)90706-5)»
- Milton, K.** (1980). *The foraging strategy of howler monkeys: a study in primate economics*. New York, NY, USA: Columbia University Press.
- Nagy, K.A. & Milton, K.** (1979). Energy metabolism and food consumption by wild howler monkeys (*Alouatta palliata*). *Ecology*, 60(3): 475-480 DOI «<https://doi.org/10.2307/1936066>»
- Nakamura, N.; Amato, K.R.; Garber, P.; Estrada, A.; Mackie, R.I. & Gaskins, H.R.** (2011). Analysis of the hydrogenotrophic microbiota of wild and captive black howler monkeys (*Alouatta pigra*) in Palenque National Park, México. *American Journal of Primatology*, 73(9): 909-919. DOI «<https://doi.org/10.1002/ajp.20961>»
- Ostro, L.E.T.; Silver, S.C.; Koontz, F.W.; Young, T.P. & Horwich, R.H.** (1999). Ranging behavior of translocated and established groups of black howler monkeys (*Alouatta pigra*) in Belize, Central America. *Biological Conservation*, 87(2): 181-190. DOI «[https://doi.org/10.1016/S0006-3207\(98\)00061-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3207(98)00061-5)»
- Pavelka, M.S.M. & Knopff, K.H.** (2004). Diet and activity in black howler monkeys (*Alouatta pigra*) in southern Belize: does degree of frugivory influence activity level? *Primates*, 45: 105-111. DOI «<https://doi.org/10.1007/s10329-003-0072-6>»
- Pérez-Gil Salcido, R.; Jaramillo Monroy, F.; Muñiz Salcedo, A.M. & Torres Gómez, M.G.** (1996). *Proyecto de importancia económica de los vertebrados silvestres de México*; (p. 215). México D.F.; México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO).
- Pires, M.M.; Guimarães Jr, P.R.; Araújo, M.S.; Giaretta, A.A.; Costa, J.C.L. & Dos Reis, S.F.** (2011). The nested assembly of individual-resource networks. *Journal of Animal Ecology*, 80(4): 896-903. DOI «<https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2011.01818.x>»
- Pozo-Montuy, G. & Serio-Silva, J.C.** (2006). Comportamiento alimentario de monos aulladores negros (*Alouatta pigra*) Lawrence, Cebidae) en hábitat fragmentado en Balancán, Tabasco, México. *Acta Zoológica Mexicana (n.s.)*, 22(3): 53-66. Recuperado de «<http://www.scielo.org.mx/pdf/azm/v22n3/v22n3a5.pdf>»
- Ramírez-Julián, R.** (2010). *Respuestas conductuales de monos aulladores negros 'Alouatta pigra', viviendo en remanentes de vegetación entre pastizales, Balancán, Tabasco, México*, (Tesis de Maestría en Ciencias, publicado). Xalapa, Veracruz, México. Instituto de Ecología A.C. (INECOL).
- Sánchez-Garzón, N.X.** (2016). *Redes de interacción entre monos aulladores negros ('Alouatta pigra') y plantas para su alimentación y descanso diurno en Tabasco, México*, (Tesis de Maestría en Ciencias, publicada). Xalapa, Veracruz, México. Instituto de Ecología A.C. (INECOL).
- Saunders, D.A.; Hobbs, R.J. & Margules, C.R.** (1991). Biological consequences of ecosystem fragmentation: a review. *Conservation Biology*, 5(1): 18-32. Recovered from «[https://www.fs.fed.us/rm/pubs/rmrs\\_gtr292/1991\\_saunders.pdf](https://www.fs.fed.us/rm/pubs/rmrs_gtr292/1991_saunders.pdf)»
- Schlichte, H.J.** (1978). A preliminary report on the habitat utilization of a group of howler monkeys (*Alouatta villosa pigra*) in the National Park of Tikal, Guatemala. In: Montgomery, G.G. (ed.); *Ecology of arboreal folivores*, (pp. 551-559). Washington, D.C.; USA: Smithsonian Institution Press.
- Silver, S.C.; Ostro, L.E.T.; Yeager, C.P. & Dierenfeld, E.S.** (2000). Phytochemical and mineral components of foods consumed by black howler monkeys (*Alouatta pigra*) at two sites in Belize. *Zoobiology*, 19(2): 95-109. DOI «[https://doi.org/10.1002/1098-2361\(2000\)19:2<95::AID-ZOO1>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/1098-2361(2000)19:2<95::AID-ZOO1>3.0.CO;2-D)»
- Silver, S.C.; Ostro, L.E.T.; Yeager, C.P. & Horwich, R.** (1998). Feeding ecology of the black howler monkey (*Alouatta pigra*) in Northern Belize. *American Journal of Primatology*, 45(3): 263-279. DOI «[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2345\(1998\)45:3<263::AID-AJP3>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2345(1998)45:3<263::AID-AJP3>3.0.CO;2-U)»
- Stevenson, P.R.** (2000). Seed dispersal by woolly monkeys (*Lagothrix lagotricha*) at Tinigua National Park, Colombia: dispersal distance, germination rates, and dispersal quantity. *American Journal of Primatology*, 50(4): 275-289. DOI «[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2345\(200004\)50:4<275::AID-AJP4>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2345(200004)50:4<275::AID-AJP4>3.0.CO;2-K)»
- Worman, C.O. & Chapman, C.A.** (2005). Seasonal variation in the quality of a tropical ripe fruit and the response of three frugivores. *Journal of Tropical Ecology*, 21: 689-69. DOI «<https://doi.org/10.1017/S0266467405002725>»

**C) Seasonal and habitat effects on the gut microbiota composition of black howler monkeys (*Alouatta pigra*) in fragmented rainforest. Hernández-Rodríguez D, Rebollar E.A.; Serio-Silva J.C and Azaola-Espinosa A.**

## **Seasonal and habitat effects on the gut microbiota composition of black howler monkeys (*Alouatta pigra*) in fragmented rainforest**

### **Abstract**

The gut microbiota carries out important metabolic functions such as immune system activation and degradation of diet components to obtain energy and nutrients. These functions affect the host's health and depend on the microbial species present in the gut and their interactions with the host's diet components. In this study, we analyzed the diversity and structure of the gut microbiota of black howler monkeys (*Alouatta pigra*) in two disturbed tropical forest sites across seasons (dry, rainy, and nortes seasons) and two captivity sites. We hypothesized that captivity would cause less bacterial diversity, and a significant modification in the main bacterial phyla; on the other hand, temporal variation would also mean variations in the composition of the microbiome derived from diet adaptation.

Our results indicate that the howler monkey gut microbiota differed among sites, with wild and captive howlers showing the most dramatic differences. Firmicutes and Bacteroidetes were the dominant phyla but their proportions varied, principally in captive monkeys. The intestinal microbial community differed across seasons and these changes also coincided with changes in dietary content. Specifically, greater bacterial diversity was found during the nortes season, followed by the rainy season, and a significantly lower diversity was found during dry seasons. We conclude that captivity strongly modifies the gut microbial structure, followed by seasonal changes linked to differences in vegetation. We suggest that dietary changes due to captive conditions and across seasons in wildlife are a major factor modulating gut microbiome composition in black howler monkeys.

**Keywords:** *Alouatta*, gut microbiota, habitat fragmentation, metagenomics.



## **Introduction**

### *A) Microbiota previous studies on Vertebrates and Primates*

Vertebrates establish symbiotic relationships with the microorganisms they harbor and that have co-evolved with them, (Shapira, 2016). The set microorganisms-genome make up the microbiome. (Balter, 2012; Ley *et al.* 2008; Backhed, *et al.* 2005). In other hand, the gut microbiota in vertebrates carries out important metabolic functions such as degradation of the components of the diet to obtain energy and nutrients. It has a prominent role in vitamin synthesis and helping in the absorption of minerals such as calcium, phosphorus, magnesium, and iron. Also, it processes otherwise indigestible components of the diet, such as plant polysaccharides (LeBlanc *et al.*, 2013; Mackie, 2002).

Beside this, microbial metabolic functions have a great impact on host health and nutrition; however, these functions depend on the composition and proportion of the microbial species present and their interactions with the components of the host's diet (Haro, *et al.*, 2004).

Several authors doing research conducted with wild primates suggests that changes in diet associated with habitat disturbance or captivity strongly influence the composition of their microbiota (Amato *et al.*, 2013; Cabana *et al.*, 2019; Amato *et al.*, 2013). As we know, non-human primates are found in a wide variety of habitats, from tropical forests to shrub areas; in most of these habitats, seasonal influences produce a temporary variation in food availability (Hill, 1997), which has a significant impact on primates' diets and their use of the habitat (Chaves and Bicca-Marques, 2013).

Some experimental studies assume that these changes in the host diet in different seasons impact the gut microbiome composition, and that is important to clarify the relationship between habitat, diet, and the microbiome and to understand how these factors interact and in what way they affect the host (Amato *et al.*, 2013; Holmes *et al.*, 2012; Palmer *et al.*, 2007).

### *B) Microbioma and *Alouatta pigra* relationship*

It has been reported that howlers (*Alouatta pigra*) that occupy habitats of different quality develop different gut microbiomes, since animals in disturbed habitats generally consume different types of food resources than their counterparts in undisturbed habitats (Amato *et al.*, 2013). It is clear in

several reports that *Alouatta*, like the other primates, depends directly on plant resources as food so is influenced by the seasonal availability of plants which responds to their knowledge of the distribution, abundance, palatability, digestibility, and nutritional value of plant resources in their habitat (Milton, 1980).

Under such circumstances, *A. pigra* is considered a species of ecological importance due to its role as a seed disperser (Serio-Silva and Rico-Gray, 2002) and as an indicator organism of ecosystem status (Pérez Gil *et al.*, 1996; Vásquez-Aguilar *et al.*, 2020). *A. pigra* is currently in danger of extinction (NOM-059-SEMARNAT-2010; Marsh *et al.*, 2008), the loss and fragmentation of its habitat being the main factors that have contributed to its population decline (Estrada and Coates-Estrada, 1996).

Because of their eating habits, howler monkeys are considered folivore-frugivorous; studies have revealed that they consume considerable amounts of fruits, flowers, and leaves according to their availability. In degraded habitats and captivity conditions, howlers' wellness depends a lot on the diet meeting the necessary nutrients and that physiological conditions allow adequate assimilation (Sanz, 2004), since it is known that disturbances in the microbiome caused by drastic changes in diet can be harmful to health (Blumberg and Powrie, 2012; Cabana *et al.*, 2019; Clayton *et al.*, 2016; Holmes *et al.*, 2012).

Characterizing the structure of the intestinal microbiome is the first step for an intestinal ecosystem study and the subsequent study of microorganism–microorganism and host–microorganism interactions (Hale *et al.*, 2015; Obregón-Tito, 2015; Zoetendal, 2004). So, study of the gut microbiome in wild primates can provide a greater understanding of the functional relationship that they have with their microbes (Nelson, 2012), which would allow identification of the crucial processes that influence the intestinal microbiota and that are relevant to the natural lifestyle of howler monkeys and captivity.

The objective of this study was to determine the intestinal microbiota composition in black howler monkeys, as well as the influence of habitat, seasonality, and feeding on its structure. Here, we test the hypothesis that howlers occupying different habitats acquire different microbiomes because they have different feeding patterns, particularly in captive howler monkeys. We also verify a microbiome transition given by seasonal changes and food availability.

## Materials and methods

### Materials and methods

#### *Study site*

The study was conducted between March 2016 and January 2017 in two forest fragments in the municipality of Balancan, Tabasco, southeast Mexico (17°46'48.46" N and 91°30'22.11" W) (Figure 1). This area is a highly perturbed landscape that has suffered extensive forest loss and fragmentation of habitat. The original flood plain forests experienced severe degradation, losing around 80% of their original cover by human activities, resulting in livestock areas, farmland, and fragmented rainforest (Aristizabal-Borja *et al.*, 2011; Pozo-Montuy and Serio-Silva, 2007; Vásquez-Aguilar *et al.*, 2020).

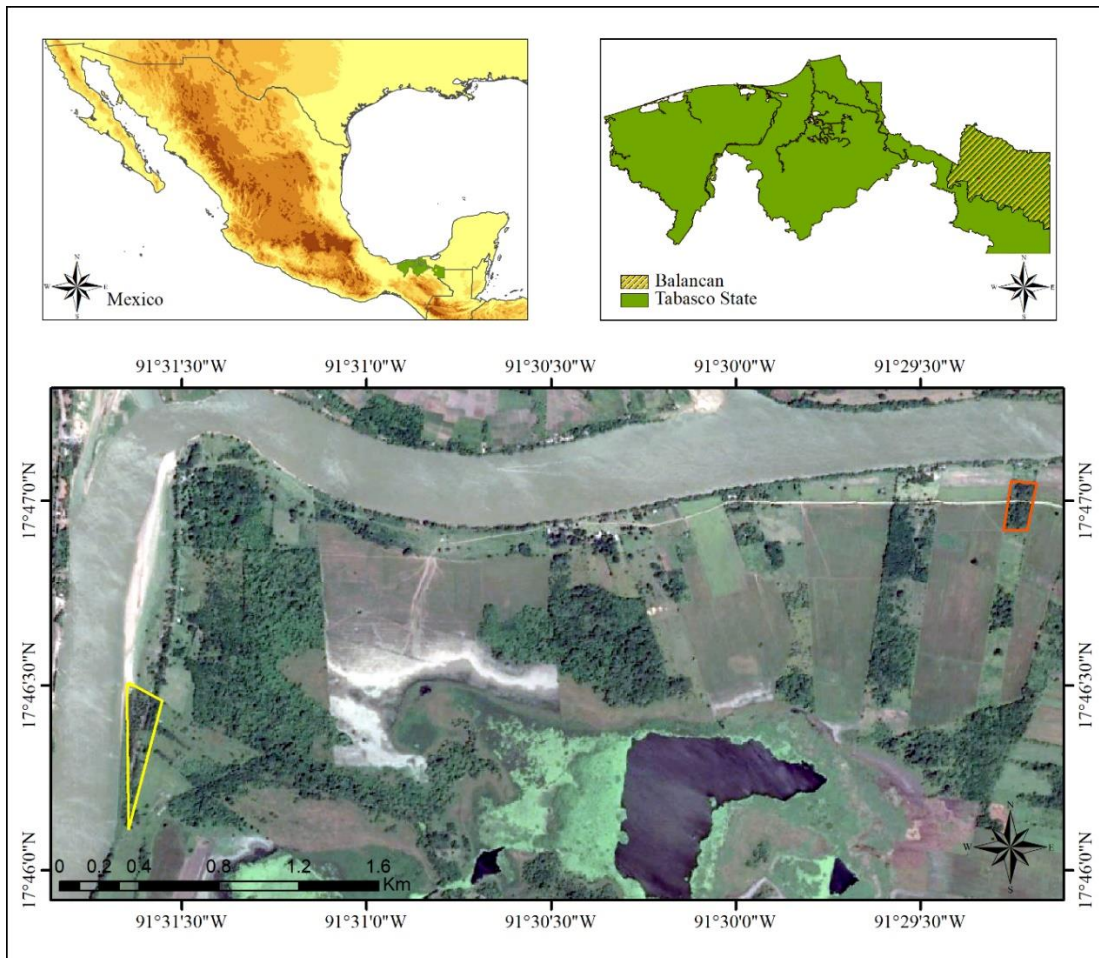
The region shows a predominantly subhumid warm climate with rains in summer and annual temperature of 26.3 °C and is marked by three seasons: Rainy in a period from May to October, Nortes from November to January, and Dry from February to April (Aristizabal-Borja *et al.*, 2011; Pozo-Montuy and Serio-Silva, 2007).

The nortes season in the region is characterized by generating variations in atmospheric pressure, temperature and humidity, it originates with the presence of two air masses with different physical properties; there are decreases in temperature, wind acceleration and small and discontinuous rainfall (National Meteorological Service. SMN, Mexico; 2019).

Two natural habitat – fragmented sites were selected to carry out the study within the fragment. The first site named “El playon 2” , it is composed of a diversity of trees and shrubs bordering a section of the Usumacinta River, presents native vegetation and that introduced by man, and has been modified by anthropogenic activities such as livestock and housing. Moreover, it has a record of high flood potential, especially in the months of May to October, corresponding to the Rainy season.

A second site named “El cuadrado” is catalogued as Secondary Vegetation Under Conservation (SVUC) is a small remnant of forest that is surrounded by agricultural crops, it is located on higher ground, has no historical record of flooding, and a lower degree of disturbance; there is no presence of domestic animals within the fragment.

The natural habitats—fragmented sample sites, are not connected and are separated by greater than the territories that excluding the migration of groups between habitats.



**Figure 1.** Study site map. Location of natural habitat-fragmented study sites. Yellow triangle RSV site, orange rectangle SVUC site.

The first captivity site named as YMK (abbreviation of the captive site name “Yumká”) in this study, it is classified as a “Center for Coexistence and Interpretation of Nature” and is located in Tabasco state, Mexico, and whose purpose is environmental education, conservation, and protection of the species they host. Currently it has an approximate number of 946 individuals of about 80 different species in sections distributed in 101 hectares.

The other captivity site named as BCLR (abbreviated from the name of the region where the captive site is located “Bacalar” for this study, it was one of six Centers for Wildlife Conservation and Research and was in Quintana Roo state, Mexico. Its activities were based on the development of actions such as the reception, rehabilitation, protection, recovery, reintroduction, or channeling of rescued species, voluntarily delivered, or insured by the competent authorities. Currently these centers ceased to exist.

#### *Fecal sample collection*

Samples were collected for each season between March 2016 and January 2017, from two groups of black howlers inhabiting two forest remnants in Balancan, Tabasco, Mexico (RVS Group, n = 6 and SVUC Group, n = 6).

Additional samples were obtained from two groups of howlers in captivity, belonging to two different wildlife care sites and fed with atypical diets (YMK Group n = 4 and BCLR Group n = 5).

Howlers were identified and sexed. We collected a portion of fresh feces (5–10 g) from each subject, which was collocated into a sterile tube with 99% ethanol immediately after defecation and kept at 4 °C until DNA extraction for subsequent molecular analyses.

#### *Feeding behavior data collection*

In natural habitat – fragmented, feeding records were by observation using the “Focal Animal” method for sixty minutes for each individual (Amato *et al.*, 2013). Tree species used by wild monkeys to feed were observed and recorded to identify preferences at each natural habitat – fragmented site and each of the three seasons of the year. Based on previous reports made at the same site, feeding frequencies and selection of plant parts were considered (Sánchez-Garzón, 2016; Aristizábal, 2013).

During feeding (active consumption of food resources), we recorded each food item according to five phenophases [young leaves (YL), mature leaves (ML), flowers (FL), immature fruits (IF), and ripe fruits (RF)] and plant species were identified with common and scientific name.

The diet characteristics data of captive groups were obtained from records at the rehabilitation center. and include, ingredient, quantity, and frequency.

### *Molecular analyses*

Microbial DNA was extracted from fecal samples using a ZR fecal DNA Mini Prep kit (Zymo Research®, CA, USA). The concentration and quality of extracted DNA were measured using a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific). All DNA samples were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until further use. The V9 region of the 16S ribosomal RNA gene was amplified by polymerase chain reaction (35 cycles of  $94^{\circ}\text{C}$  (1 min),  $60^{\circ}\text{C}$  (15 s),  $72^{\circ}\text{C}$  (4 min)) using the primers Lm3 (5'-CGGGTGCTTcCCCACCTTTCATG-3') and Lm26 (5'-GATTCTGGCTCAGGATGAACG-3') designed by Kaufmann et al. (1997) which amplify a fragment of 1.35 kb.

Samples were standardized to at least 5 ng/ $\mu\text{l}$  before being sent to the CGEB – Integrated Microbiome Resource (IMR), Nova Scotia, Canada, for library preparation and sequencing. Amplified polymerase chain reaction libraries were sequenced using an Illumina MiSeq system (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA).

### *Bioinformatics and statistical analysis*

A total of 48 samples were successfully sequenced, and they were analyzed using Quantitative Insights into Microbial Ecology (QIIME 2) v.2019.4 (Caporaso et al., 2011). Single end reads (137 bp) were joined using fastq-join and filtered for quality. Sequences that contained read lengths shorter than 400 bp were removed and adapters/index sequences were trimmed.

Operational taxonomical units (OTUs) were de novo clustered with a 97% similarity cutoff using q2-vsearch. The taxonomic classification of the OTUs was analyzed by the SILVA -132-99-515-806-nb-classifier 16S rRNA database with a confidence threshold of 99%. OTU rarefaction curves and alpha diversity Shannon index for each sample were calculated with QIIME 2. The proportions of bacterial taxa at the phylum, family, and genus levels were compared between habitat conditions (wild and captivity) and different seasons. The beta diversity of the bacterial community structure was obtained by calculating weighted and unweighted UniFrac distances.

Using the distance matrices, the adonis function of R 3.3.1 was run with the vegan package version 2.4–3 (Oksanen et al., 2011), which divides the distance matrix between sources of

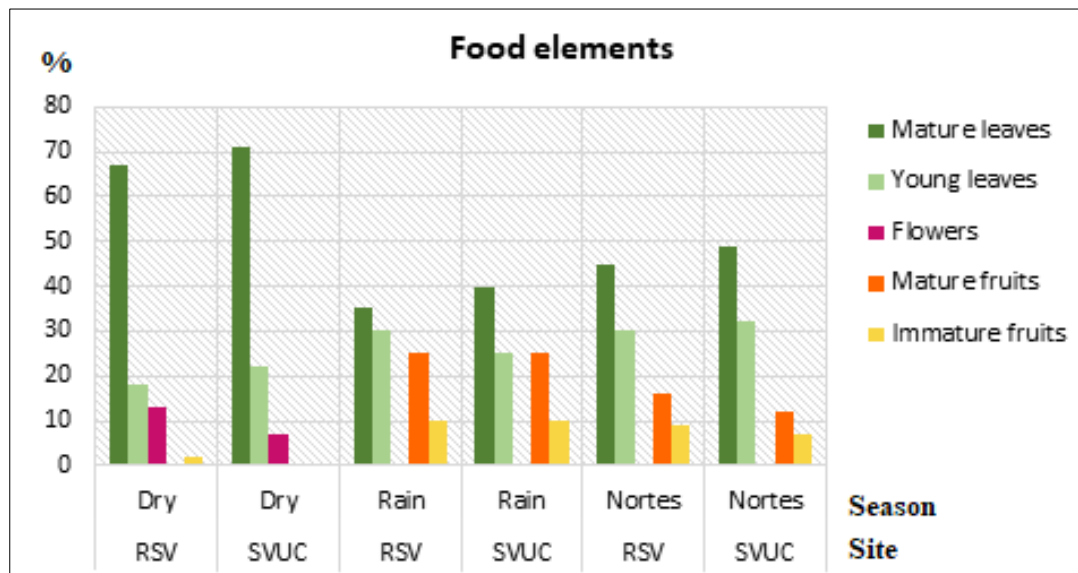
variation, fits linear models to distance matrices, and uses a permutation test with pseudo-F relationships to obtain p values.

## Results

### *Feeding*

Derived from the hours of observation accumulated during the three seasons (n = 144 h), we found that the monkeys at both sites based their diet on 18 tree species in total, 12 for the RSV fragment and six for the SVUC fragment.

In the RSV site, the preferred species was *Pithecellobium lanceolatum*, while for the SVUC site, the tree species with more feeding events was *Albizia leucocalyx* (Supplementary Figure 1). The selection of plant parts for feeding showed changes between sites but even more between seasons (Figure 2).



**Figure 2.** Food elements selected by *A. pigra* in each season. Graph showing the food elements consumed by each group of *Alouatta pigra* howler monkeys in the two wildlife sites and the three seasons. In both sites the food items selection was similar. The consumption of leaves was predominant in the three seasons, although there an increase in the consumption of flowers and fruits in the seasons in which these are available.

In the dry season, the monkeys at the RSV site consumed 85% leaves (67% ML and 18% YL), while for the SVUC site it was 93% (71% ML and 22% YL). FL consumption was only observed in the dry season (13% for the RSV site and 7% for the SVUC site); fruit consumption only occurred at the RSV site (2%) and there was no consumption of these at the SVUC site.

In the rainy season, the leaves represented 65% of the consumption at both sites: 35% ML and 30% YL for RSV, and 40% ML and 25% YL for SVUC. Fruit consumption showed an increase compared to the previous season, with 35% for each site and the same proportion of 25% RF and 10% IF.

In the nortes season, leaf consumption was 75% (45% ML and 30% YL) for the RSV site and 81% (48% ML and 32% YL) for SVUC; less fruit was observed, represented by 25% (16% RF and 9% IF) in the RSV region and 19% (12% RF and 7% IF) in the SVUC site.

The captive monkeys' diet varies from site to site, based on a variety of fruits, vegetables, and concentrated foods with little variability throughout the year (Table 1).

### *Bacterial community profile*

At the 97% similarity cutoff, 540 different OTUs were identified for the howler monkeys; the corresponding rarefaction curves tended to reach the saturation plateau (Supplementary Figure 2).

Phylogenetic classification of the bacterial sequences of howler monkeys resulted in 15 different phyla. The predominant phyla were Bacteroidetes and Firmicutes, representing  $33 \pm 17.7\%$  and  $49.63 \pm 19.5\%$ ; the other 13 phyla (Tenericutes, Cyanobacteria, Spirochaetes, Proteobacteria, Verrucomicrobia, Euryarchaeota, Synergistetes, Actinobacteria, Elusimicrobia, WPS-2, Epsilonbacteraeota, Lentisphaerae, and Fusobacteria) had lower relative abundance (Figure 3).

The bacterial community profile by habitat showed a major proportion of Firmicutes in wild habitats ( $59.57 \pm 13.36\%$  in RSV and  $54.65 \pm 12.71\%$  in SVUC) followed by Bacteroidetes ( $30.20 \pm 17.61\%$  in RSV and  $24.99 \pm 18.06\%$  in SVUC). Instead, in captive sites, the predominant phyla were Bacteroidetes ( $45.87 \pm 4.48\%$  in BCLR and  $46.78 \pm 17.50\%$  in YMK).



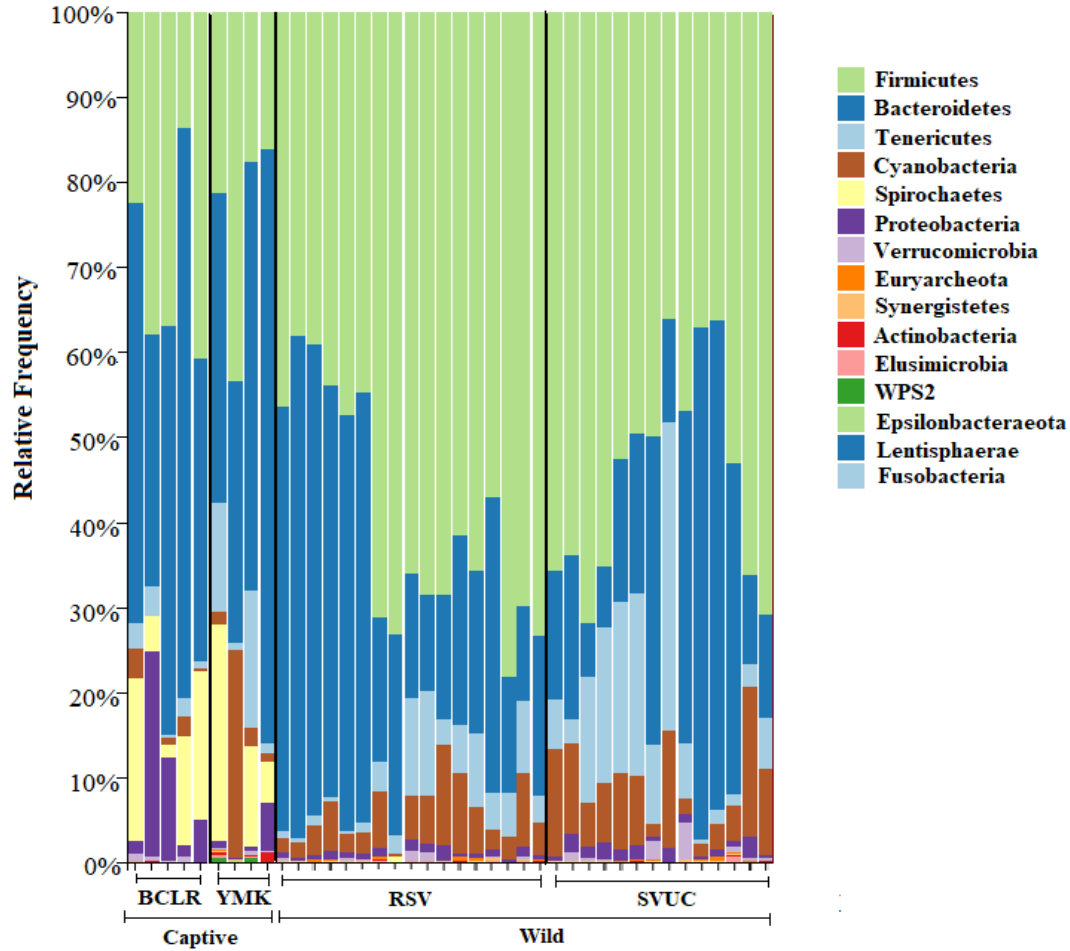
**Table 1.** Captivity diet. Ration for 2.1 adult monkeys of 5 - 7 kg:

<b>SITE</b>	<b>INGREDIENT</b>	<b>QUANTITY</b>	<b>FREQUENCY</b>
<b>YMK</b>	Carrot	400g	Daily
	Beetroot	150g	Daily
	Broccoli	150g	Daily
	Corncob	90g	Daily
	Apple	150g	Monday and Friday
	Orange	150g	Tuesday
	Cantaloupe	150g	Thursday
	Papaya	150g	Saturday
	Banana	250g	Sunday and Wednesday
	Cucumber	150g	Daily
	Celery	Three stems	Daily
	Green bean	300 g	Daily
	Italian pumpkin	400g	Daily
	Guava	One piece	-
	Lechuga	150g	Daily
	Chard	300g	Daily
	Alfalfa	300g	Daily
Chaya	300g	Daily	
Espinaca	300g	Daily	
Croquettes *	700g	Daily	
<b>BCLR</b>	Apple	½ piece	Daily
	Banana	1 ½ piece	Daily
	Papaya	½ slice	Daily
	Carrot	¾ piece	Daily
	Pepper	¼ piece	Daily
	Celery	¼ piece	Daily
	Squash	¼ piece	Daily

Spinach	a handful	Daily
Coriander	Half handful	Daily
Beetroot	4- 5 slices	Daily
Wholemeal bread	¾ slices	Daily
Ramon ( <i>Brosimum alicastrum</i> )	free consumption	2 - 3 times a day
Avocado	Ns	Additional
Cottage cheese		Additional
Nestlé Gastro protect ® yogurt	Ns	Additional
Mango	Ns	Additional
Pera	Ns	Additional
Croquettes *	Ns	Daily

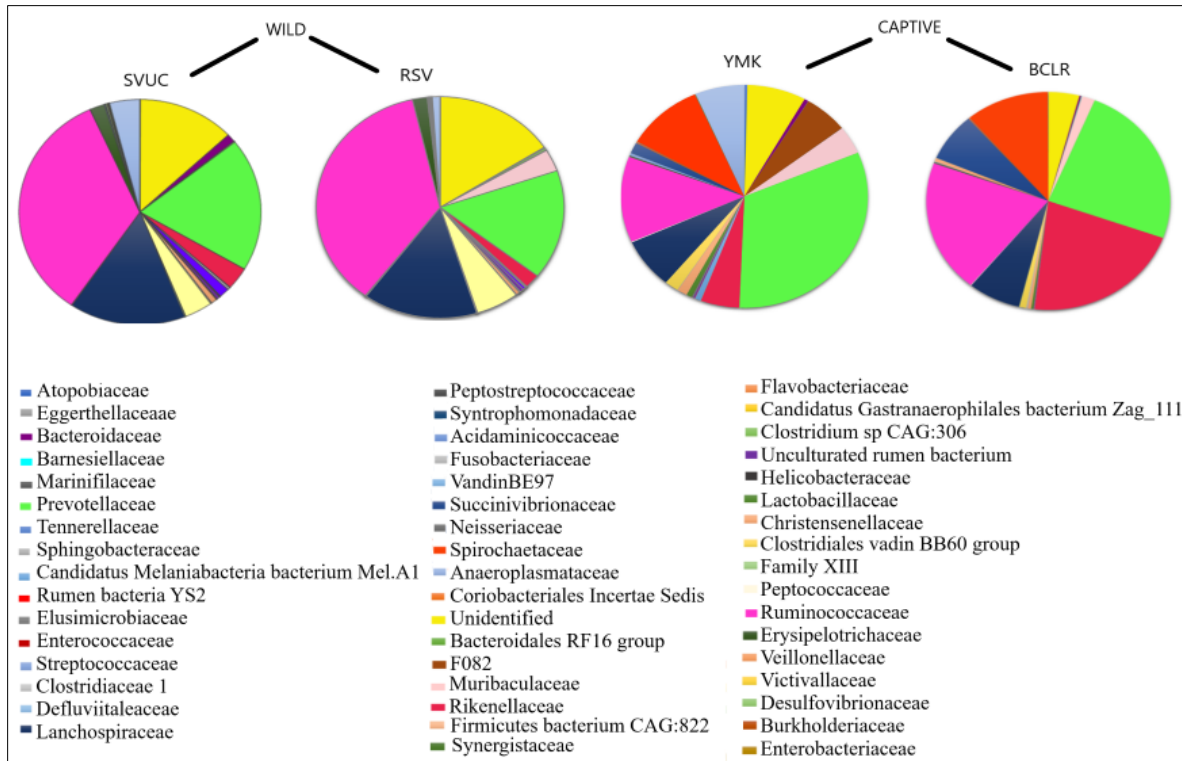
\*Croquettes Mazuri® Leaf-Eater Primate Diet, formulated for primates such as langurs and howlers, which require a high fiber-diet. Ingredients: shelled soybean meal, ground soybean hulls, ground corn, corn gluten meal, ground oats, dried beet pulp, dried apple pomace, soybean oil, dehydrated alfalfa meal, dicalcium phosphate, calcium carbonate, flaxseed, dry brewer's yeast, salt, l-ascorbyl-2-polyphosphate (stabilized vitamin C), dl-methionine, pyridoxine hydrochloride, choline chloride, folic acid, vitamin A acetate, cholecalciferol, d-alpha tocopheryl acetate (form of vitamin E), calcium pantothenate, ferrous sulfate, menadione sodium bisulfite complex (source of vitamin K), preserved with mixed tocopherols of vitamin E), biotin, rosemary extract, nicotinic acid, citric acid, thiamine mononitrate , vitamin B12 supplement, riboflavin supplement, zinc oxide, manganous oxide, ferrous carbonate, copper sulfate, zinc sulfate, calcium iodate, cobalt carbonate and sodium selenite.

Alpha diversity by Shannon index was similar in wild habitats (RSV = 7.58, SVUC = 7.6); in captivity, the index was lower (BCLR = 6.7, YMK = 6.6). The Kruskal–Wallis test also showed significant differences when comparing each site of free life with those of captivity (BCLR-RVS  $q = 0.0260$ , BCLR-SVUC  $q = 0.0309$ , YMK-RSV  $q = 0.0260$ , YMK-SVUC  $q = 0.03095634$ ) (Supplementary Table 3).



**Figure 3.** Bacterial phyla by site. Relative abundances at the phylum level of the gut bacterial community from captive (BCLR, YMK) and wildlife (RSV, SVUC) *A. pigra* howler monkeys.

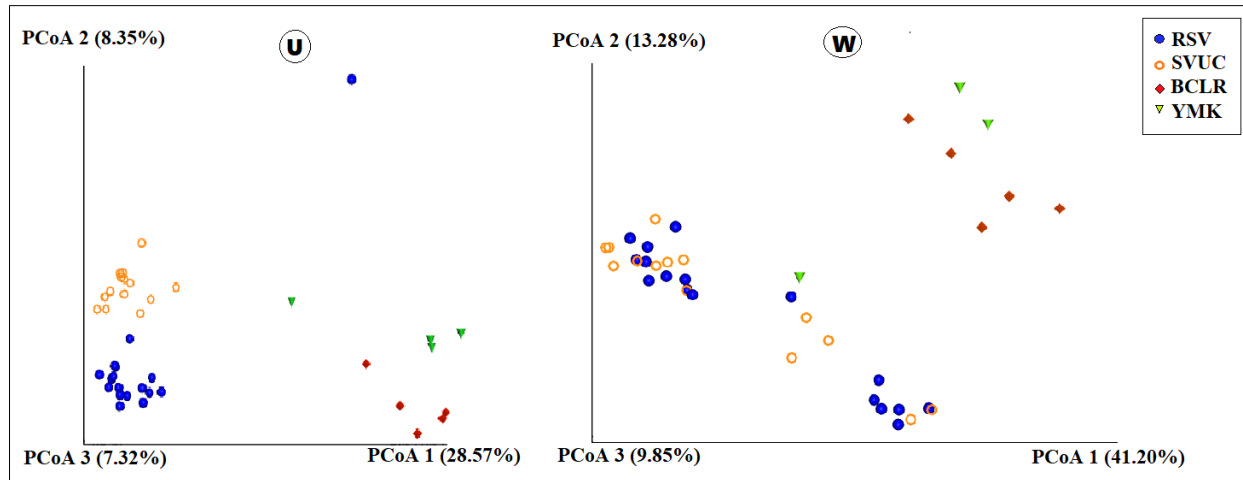
At the family level (Figure 4), some families were only found in captive monkeys: the *Lactobacillaceae* family, recognized for grouping beneficial bacterial genera, was found in low proportions (YMK =  $0.92 \pm 0.42\%$  and BCLR =  $0.41 \pm 0.36\%$ ), and a considerable proportion of the *Spirochaetaceae* family, which groups potentially pathogenic genera, was found (YMK =  $10.53 \pm 11.0\%$ , BCLR =  $11.05 \pm 9.0\%$ ).



**Figure 4.** Family level by site. Bacterial diversity at the Family level of the gut bacterial community from captive (BCLR, YMK) and wildlife (RSV, SVUC) *A. pigra* howler monkeys.

Principal coordinate analysis (PCoA) based on weighted UniFrac distances showed differences between wild and captive groups, that consume different diets, although we can find similarity in the groups of OTUs present between both groups of wild animals (Figure 5).

This differentiation between wild and captive groups was confirmed by the adonis test (weighted UniFrac: Pseudo F = 5.76, R<sup>2</sup> = 0.32, p < 0.001; unweighted UniFrac: Pseudo F = 7.32, R<sup>2</sup> = 0.37, p < 0.001). The bacterial community structure was more similar between wild groups and between captive groups.



**Figure 5.** Principal coordinates analysis for the differentiation of fecal bacterial community based on UniFrac distances between captive (BCLR, YMK) and wildlife (RSV, SVUC), *Alouatta pigra* howler monkeys. In unweighted samples (U), the groupings and distances between the four groups are clearer with a major separation between captivity and wildlife groups. In the weighted analysis (W), we can see a grouping between the two groups of howlers in free life that indicates similar patterns of abundance.

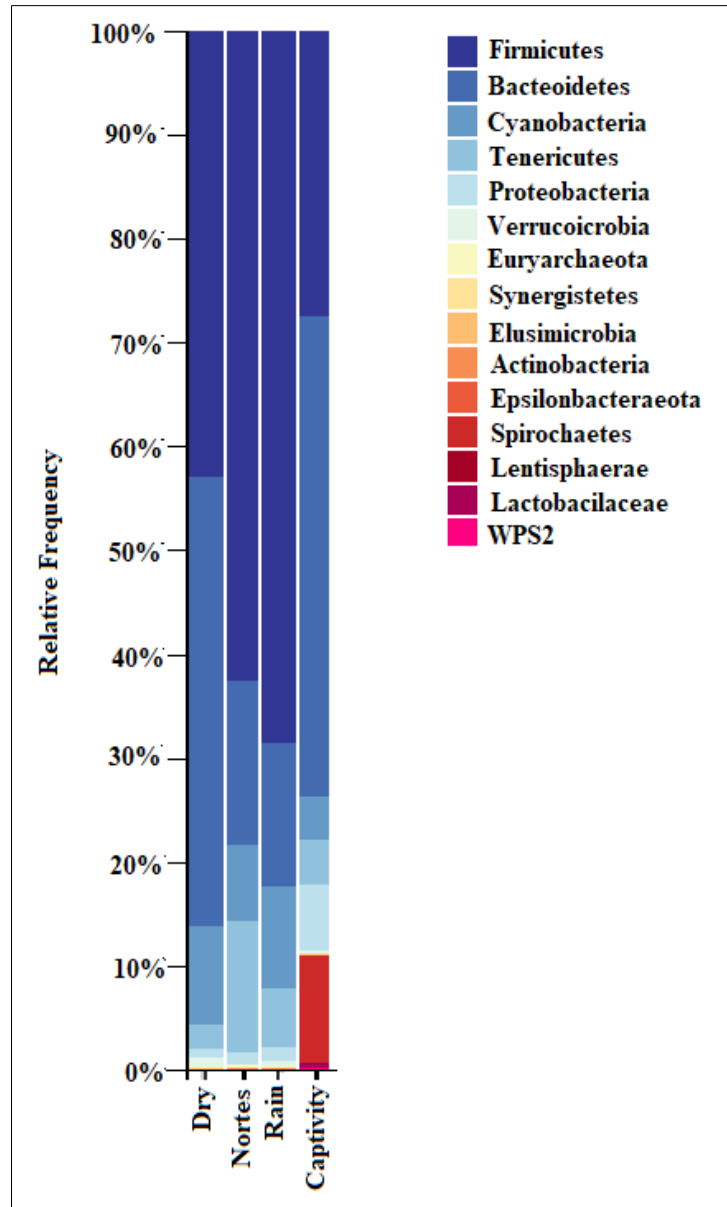
#### *Seasonal gut microbial changes in A. pigra*

The results obtained for each season show important changes in food, especially in the Rainy season when there is greater presence and consumption of fruits.

During the dry season, howlers consumed 89% leaves, in the rainy season, there was an increase in the consumption of fruits compared to the previous season, covering 35% of the total diet. In this season, the leaves accounted for 65% of consumption, in the nortes season, leaf consumption was 78% of the diet, and fruit consumption accounted for 23%.

The diet transition is reflected by changes in the composition of the intestinal microbial community. Ten bacterial phyla were found that were constant in all three seasons; the main differences were found in the rainy season (Figure 6), being the only season in which Spirochaetes was found, but Lentisphaerae was absent.

In the rainy and nortes seasons, Firmicutes was the most abundant phylum (rainy =  $68.5 \pm 3.05\%$ , nortes =  $62.4 \pm 12.24\%$ , Dry =  $43.9 \pm 5.58\%$ ); Bacteroidetes was the most abundant phylum in the Dry season and the second most abundant in the other two seasons (Dry =  $50.7 \pm 7.67\%$ , Nortes =  $16.4 \pm 7.96\%$ , Rainy =  $15.4 \pm 4.16\%$ ).



**Figure 6.** Bacterial Phyla by season. Shown differences in relative abundances at the phylum level in the gut bacterial community from *Alouatta pigra* howler monkeys in three seasons (dry, nortes and rainy). The bacterial diversity of howler monkeys in captivity is included to observe differences with these monkeys that have a stable diet throughout the year.

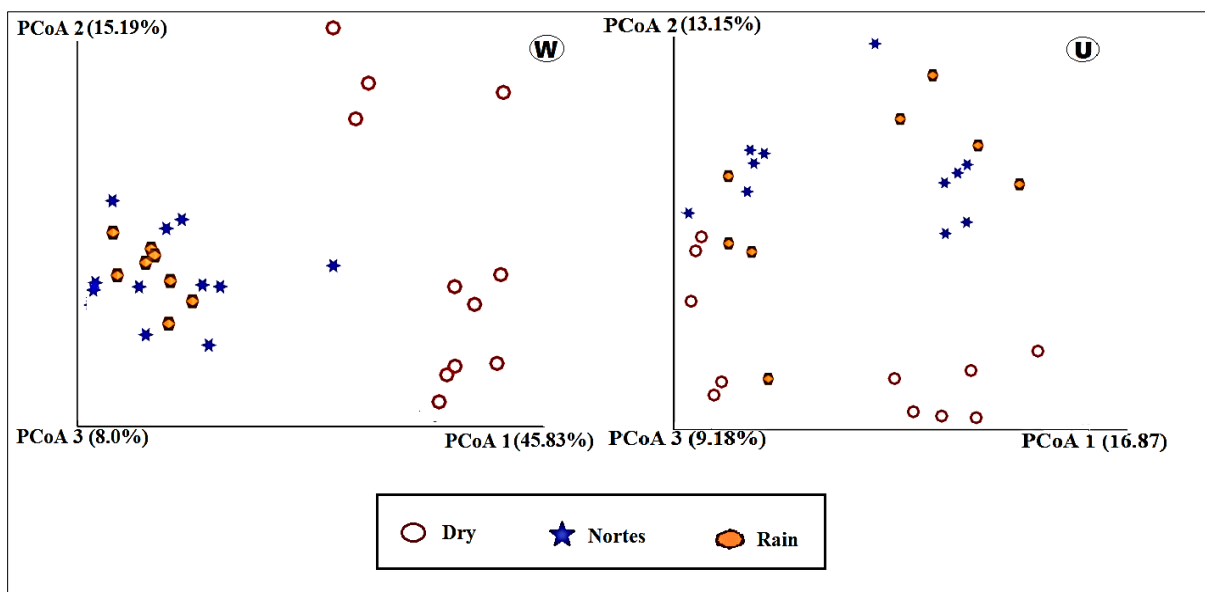
A similar number of bacterial families were found in the rainy season ( $n = 69$ ) and nortes season ( $n = 67$ ) and a lower number in the Dry season ( $n = 61$ ). *Ruminococcaceae* was the most abundant family in the nortes ( $37.6 \pm 9.5\%$ ) and Rainy seasons ( $44.7 \pm 9.8\%$ ), while for the Dry season, *Ruminococcaceae* ( $22.8 \pm 4.0\%$ ) was less abundant than *Prevotellaceae* ( $27.38 \pm 8.9\%$ ).

These results show a pattern in the microbiome composition concerning the changes in feeding through the seasons, where Nortés seems to be the midpoint of the transition between the other two seasons.

The bacterial diversity (Shannon index) showed a greater OTU diversity in the nortes (7.9) and rainy seasons (7.7) in contrast to the dry season (6.9) (Kruskal–Wallis test showed significant differences between the three seasons (dry–nortes  $q = 0.00345706$ ; dry–rainy  $q = 0.01986441$ , nortes–rainy  $q = 0.03898861$ ) (Supplementary Table 2).

In captive *A. pigra* samples, no temporal variation was measured, because they have a steady diet throughout the year. However, the differences between these groups in captivity and those ranging free varied considerably regardless of the season.

The PCoA based on UniFrac distances showed that nortes and rainy seasons were separated in terms of the bacterial community structure with PCoA1, which accounted for 41.20% (unweighted analysis) and 28.57% (weighted analysis) of the total variation (Figure 7). The adonis test showed significant differences between the three seasons (weighted UniFrac: Pseudo  $F = 10.50$ ,  $R^2 = 0.43$ ,  $p < 0.001$ ; unweighted UniFrac: Pseudo  $F = 2.78$ ,  $R^2 = 0.17$ ,  $p < 0.001$ ). However, the structure of the bacterial community was more similar in abundance and diversity between the nortes and rainy seasons.



**Figure 7.** Seasonal beta diversity by PCoA ordination of UniFrac distances in the gut microbiota of howler monkeys. It shows the Principal coordinates analysis for the differentiation of fecal bacterial community of *Alouatta pigra* howler monkeys based on UniFrac distances in three seasons. In weighted samples (W), the groupings and distances between seasons are clearer with a separation between dry season regarding rainy and nortes seasons. In the unweighted analysis (U). PCoA1 accounted for 41.20 % in the unweighted analysis (U) and 28.57 % in the weighted analysis (W) of the total variation between seasons.

## **Discussion**

The understanding of the various roles of the microbiome and their potential role in threatened wildlife health and conservation is of increasing interest. Here we draw upon research with black howler monkeys (*A. pigra*) to emphasize the importance of inclusion of the microbiome in the development of conservation strategies, particularly in species inhabiting disturbed habitats.

In this study, we set out to determine the intestinal microbial structure of black howler monkeys that occupy habitats in conditions of extreme fragmentation, limited food availability, and which are dependent on temporal variation. We also consider captivity as a relevant factor for the microbiome conformation of howler monkeys since their diet includes ingredients that they do not consume under natural conditions.

### *Feeding strategy, habitat, and captivity*

Previous reports have suggested that the primates in degraded habitats are exposed to limited food resources and a diminished microbiome which can affect their health (Amato *et al.*, 2013). However, comparatively examining the gut microbial taxa in habitats with extreme fragmentation, we show that black howler monkeys' feeding strategy can mediate the disturbed habitat effect.

In relation to that, howlers have been reported as a relatively tolerant species to habitat disturbance (Arroyo-Rodríguez and Dias, 2010; Garber *et al.*, 2006; Van Belle and Estrada, 2006), as they are present in patches where other Neotropical primate species cannot persist (Estrada and Coates-Estrada, 1996; Gilbert, 2003). Also, our results indicate that both dietary and environmental



mechanisms contribute to gut microbial changes in captivity as seen in previous research (Amato *et al.*, 2015; Clayton *et al.*, 2016).

Microbial species richness and diversity differed among howler monkey groups, especially in captive individuals, indicating a strong impact of the diet on the microbial composition of the howler monkeys. Various studies have documented changes in intestinal microbiomes between captive and wild groups of threatened species including non-human primates (West *et al.*, 2019). Of the microbial composition in our study groups, it stands out that the proportions of Firmicutes and Bacteroidetes differ between wild groups and captives, the proportion of Firmicutes being greater when the monkeys are in a natural state and where they can select their food.

The Firmicutes phylum contains relevant genera, including *Ruminococcus*, *Clostridium*, and *Lactobacillus* (several strains of which are probiotics), and the butyrate producers *Eubacterium*, *Faecalibacterium*, and *Roseburia* (Tremaroli and Bäckhed, 2012). All these families were found in groups of monkeys, mainly in the wild, except *Lactobacillus*, which was found only in captive monkeys. These results agree with those obtained by Amato *et al.* (2013), who mentioned that the highest levels of lactobacilli are observed in captive howlers and may be a result of high calcium supplementation in the howler diet feed and supplementation with probiotic products.

Besides that, it has been suggested that Bacteroidetes may be responsive to calorie intake, as Bacteroidetes levels increase when weight is reduced, either by fat- or carbohydrate-restricted diets (Ley *et al.*, 2006). This pattern has been observed in genetically obese mice, whose cecal microbiota is found to contain more Firmicutes and fewer Bacteroidetes than that of their lean wild-type littermates, even when the mice are fed the same low-fat and polysaccharide-rich diet (Ley *et al.*, 2005). Similar characteristics have also been observed in the fecal microbiota of obese humans (Ley *et al.*, 2006).

Despite being mostly folivorous, howler monkeys cannot degrade most complex carbohydrates and plant polysaccharides including cellulose, xylans, and inulin, and depend directly on the intestinal microbiota to perform these functions (Amato *et al.*, 2015; LeBlanc *et al.*, 2013). The intestinal fermentation patterns and, consequently, the types and quantity of short-chain fatty acids produced, are determined by the carbohydrates consumed and by the composition of the

intestinal microbiota and the metabolic interactions between its species (Tremaroli and Bäckhed, 2012). All this together affects the digestion of food and the energy production in howler monkeys.

Variation among or within the specific OTUs provided may be more informative rather than the number and diversity of OTUs. Nevertheless, the lack of a noted change in Shannon diversity between the two wild-habitat groups was unexpected. In this study, we have two groups of wild howler monkeys that live in sites with different characteristics. However, although the plant species consumed varied in quantity, the selected items were not so different; therefore, the microbiome structure did not have significant differences.

The marked difference in abundance of microbial species found among wild howler and captive monkeys is consistent with differences in diet: wild monkeys consumed a mostly folivorous diet, followed by fruits and some flowers, while captives were fed an atypical diet, including fruit, fiber-rich cereal, and other components such as concentrated foods and even fermented dairy products. The reduced number of plant species utilized by captive howlers was associated with compositional changes and reductions in the richness and diversity of their fecal microbiomes (Amato *et al.*, 2013).

The high mortality recorded by howler monkeys in captivity (Gual-Sill and Rendón-Franco, 2011; Pastor-Nieto, 2015) may be related to microbiome alterations due to diet and exposure to pathogens (Pastor-Nieto, 2015). In addition, in the study by Amato *et al.* (2013), it is mentioned that the captive monkeys used in their study died within the following 6 months.

Other groups of primates, for example, ring-tailed lemurs which have a less strict omnivorous diet, can harbor a microbiota better able to extenuate the consequences of captivity (Greene *et al.*, 2019). Although we do not know whether the microbiome changes we observed can contribute to captive primate disease or are a consequence of gastrointestinal disease caused by other factors, in humans it has been documented that gut microbiome perturbation has predictive roles in gastrointestinal diseases, particularly in predisposing individuals (Clayton *et al.*, 2016).

Though changes in the captive howler microbiome are evident, further research is needed to determine which microbiome perturbations represent dysbiosis, and which are adaptations to changes in diet and lifestyle.

### *Seasonal variation*

Here, we conducted sampling across three seasons of the year (dry, nortes, and rainy), which are marked by climatic and plant stratum changes and the presence of flowers and fruits and that make a difference to the availability of food resources that can be used by howler monkeys. Periodic resource scarcity has presumably led to the evolution of a wide range of morphological, behavioral, and physiological adaptations in primary consumers; these adaptations confer the flexibility needed to survive in environments characterized by fluctuating food supplies (Van Schaik *et al.*, 1993). Food resources vary temporally and spatially in response to differences in each habitat, rainfall, plant species phenology, and anthropogenic influences (Hicks *et al.*, 2018).

We observed that although the food was principally leaves, the consumption of fruits and flowers increased as their availability increased. Some authors have mentioned that howler monkeys have a fruit preference and will consume them whenever they are available, while leaf consumption will be greater in the absence or shortage of fruits (Stevenson, 2000). Seasonal changes in terms of the proportion of foods, dietary patterns, and relative abundance of bacterial taxa were strongly correlated with changes in primate diet, as observed in other studies (Amato *et al.*, 2015; Barelli *et al.*, 2015; Hicks *et al.*, 2018). This was reflected in the results of this study, where significant differences were found between the three seasons.

Greater richness of bacterial families was found in the rainy season, followed by the nortes season, and a minor proportion in the dry season. This could be related to a greater diversity of food resources available in the rainy season. These results are like those obtained in another study with black howler monkeys; although the most representative families were *Ruminococcaceae* and *Lachnospiraceae*, they also found variation in their proportions in each sampled period (Amato *et al.*, 2015).

The aforementioned study was carried out with groups of howlers that live in different conditions, with a lower degree of disturbance, and a home environment with a larger area, composed of different plant species than those found in our site study. This allows the animals to have a greater diversity of food resources. Nevertheless, other similarities can be found in the presence and quantity of certain bacterial groups at higher taxonomic levels.

Here, we found a relationship between higher consumption of mature leaves and a higher proportion of Bacteroidetes (dry season), and a greater proportion of Firmicutes with greater fruit consumption (rainy and nortes seasons). Similar patterns in gut microbial diversity, as well as shifts in gut microbiota composition and predicted function, have been reported for the Udzungwa red colobus (*Procolobus gordonorum*) in disturbed forests (Barelli *et al.* 2015).

It has already been documented that Bacteroidetes levels increase when the diet is carbohydrate-restricted, unlike Firmicutes that are usually more abundant when the diet is rich in carbohydrates (Clayton *et al.*, 2016). In the case of howler monkeys, fruits offer abundant macronutrients such as sugar and fat. It has also been shown that the host diet influences the relative abundance and metabolic functions of bacterial taxa in the gut; therefore, the gut microbiota composition in wild howlers also varies across seasons and habitats in direct response to these dietary changes (Amato *et al.*, 2015).

Because our sampling was done 4 to 5 months apart, we observed a very marked change between each season; however, we consider that the change is gradual and closely related to changes in the availability of food resources as the landscape changes. This gradual transition can be projected on a temporary scale if we observe that the Nortes season marks a midpoint between the Dry and Rainy seasons; even then, despite being the shortest season with a duration of only 3 months (November–January), it shows significant differences compared to the other two seasons.

These data indicate that howler monkey microbiomes are changing in response to dietary shifts, suggesting a role of the microbiome in the howlers' plasticity, in agreement with dietary variations across seasons regardless of habitat conditions.

In conclusion, our study characterized the bacterial diversity in the feces of wild and captive black howler monkeys (*A. pigra*), an endangered primate whose habitat is highly disturbed in the Balancan Tabasco region, Mexico.

Our results indicate that captivity and lifestyle disruption cause changes in the primate gut microbiota, but it is necessary to determine which microbiome perturbations represent dysbiosis and which are adaptations to changes in diet and lifestyle. The changes observed in the microbiome through the seasons reflect changes in the diet due to the temporary availability of food. These changes have been proposed to be related to the production of energy and nutrients by the

microbiota, which plays an important role in compensating the nutritional requirements of the howlers (Amato *et al.*, 2015). Finally, the results of our study may provide insights for monitoring the health status of highly fragmented areas and improving strategies for conservation of this primate.

**ACKNOWLEDGMENTS.** The authors thank Dr. Rodolfo Martínez-Mota for his assistance in the data analysis and providing feedback, and Dr. Luis Gacía-Feria for his assistance, teaching, and comments. Thanks are also due to Dr. Francisco García-Orduña and Dr. Maria de Jesus Rovirosa-Hernández for the collection of fecal samples from the howlers at Bacalar, Quintana Roo; Alinka Vanessa Olea y Wagner and Yumká Zoo for permission to obtain fecal samples from howler monkeys; and our field assistant, Lolo Tejero, for help with sample collection. This work constitutes a partial fulfilment on the part of the first author to obtain a PhD degree from the program in Animal and Agricultural Sciences at Universidad Autónoma Metropolitana (Scholarship no. 278987 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología).

## References

- Amato KR., Yeoman CJ., Kent A., Righini N., Carbonero F., Estrada A., Gaskins H., Stumpf RM., Yildirim S., Torralba M., Gillis M., Wilson BA., Nelson KE., White BA. and Leigh SR. (2013). Habitat degradation impacts black howler monkey (*Alouatta pigra*) gastrointestinal microbiomes. *The ISME J* 7, 1344–1353.
- Amato KR., Leigh SR., Kent A., Mackie RI., Yeoman CJ., Stumpf RM., ... and Garber PA. (2015). The gut microbiota appears to compensate for seasonal diet variation in the wild black howler monkey (*Alouatta pigra*). *Microbial ecology*, 69(2), 434-443.
- Aristizabal-Borja J., Pozo-Montuy G., Pérez-Torres J. and Serio-silva J. (2011). Anotaciones de la ecología alimentaria de monos aulladores negros en un fragmento con condiciones de hacinamiento (Balancán, Tabasco, México). *Univ Scient*, Vol. 16 N° 2: 140-146.
- Arroyo-Rodríguez V. and Dias PAD. (2010). Effects of Habitat Fragmentation and Disturbance on Howler Monkeys: A Review. *Am J Prim* 72:1–16.
- Backhed F., Ley RE., Sonnenburg JL. and Peterson DA. (2005). Host bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 307: 1915–20.
- Balter W. (2012). Taking Stock of the Human Microbiome and Disease. *Science* Vol. 336.
- Barelli C., Albanese D., Donati C., Pindo M., Dallago C., Rovero F., ... and De Filippo, C. (2015). Habitat fragmentation is associated to gut microbiota diversity of an endangered primate: implications for conservation. *Scientific reports*, 5, 14862.
- Blumberg R. and Powrie F. (2012). Microbiota, disease, and back to health: a metastable journey. *Sci Transl Med*; 4(137).
- Cabana F., Clayton JB., Nekaris KAI, Wirdateti W., Knights D. and Seedfort H. (2019). Nutrient-based diet modifications impact on the gut microbiome of the Javan slow loris (*Nycticebus javanicus*). *Scient rep*; 9:4078.

- Caporaso JG., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F. D., Costello E. K., ... and Huttenhower G. A. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods*, 7(5), 335.
- Chaves OM. and Bicca-Marques JC. (2013). Dietary flexibility of the brown howler monkey throughout its geographic distribution. *American journal of primatology*, 75(1), 16-29.
- Clayton JB., Vangay P., Huang H., Ward T., Hillmann BM., Al-Ghalith GA., Travis DA., Long HT., Van Tuan B., Van Minh V., Cabana F., Nadler T., Toddes B., Murphy T., Glander T., Johnson TJ. and Knights D. (2016). Captivity humanizes the primate microbiome. *PNAS*; 113:37, 10376–10381.
- Estrada A. and Coates-Estrada R. (1996). Tropical Rain Forest Fragmentation and Wild Populations of Primates at Los Tuxtlas, México. *Int J Prim*; 17: 5.
- Garber PA., Estrada A. and Pavelka MSM. (2006). New perspectives in the study of Mesoamerican primates: concluding comments and conservation priorities. In: *New perspectives in the study of Mesoamerican primates: distribution, ecology, behavior and conservation*. New York. p 576–580.
- Gilbert KA. (2003). Primates and fragmentation of the Amazon forest. In: Marsh LK, editor. *Primates in fragments: ecology and conservation*. New York: Kluwer Academic Plenum Press. p 145–157.
- Greene L. K., Bornbusch, S. L., McKenney, E. A., Harris, R. L., Gorvetzian, S. R., Yoder, A. D., and Drea, C. M. (2019). The importance of scale in comparative microbiome research: New insights from the gut and glands of captive and wild lemurs.
- Gual-Sill F. and Rendón-Franco E. (2011). Primates Mexicanos en Cautiverio. En Días P.A.; Rangel N. A. y Canales E. D. *La conservación de los primates en México*. Pp 59-77.
- Hale VL., Tan ChL., Knight and Amato KR. (2015). Effect of preservation method on spider monkey (*Ateles geoffroyi*) fecal microbiota over 8 weeks. *J Microbiol meth* 113 (2015) 16-26.

- Haros M., Collado MC., Herranz YS. & Dalmau J. (2004). Funciones metabólico-nutritivas de la microbiota intestinal y su modulación a través de la dieta: probióticos y prebióticos. *Acta pediátrica española*, 62(11), 520-526.
- Hill MJ. (1997). Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis. *Eur J Cancer Prev* 6: S43-S45.
- Holmes E., Kinross J., Gibson GR. and Burcelin R. (2012). Therapeutic modulation of microbiota-host metabolic interactions. *Sci Transl Med*; 4(137):137rv6.
- Hicks AL., Lee KJ., Couto-Rodriguez, M., Patel J., Sinha R., Guo C. ... and Karesh WB. (2018). Gut microbiomes of wild great apes fluctuate seasonally in response to diet. *Nature communications*, 9(1), 1-18.
- Kaufmann P., Pfefferkorn A., Teuber M. and Meile L. (1997). Identification and Quantification of *Bifidobacterium* Species Isolated from Food with Genus-Specific 16S rRNA-Targeted Probes by Colony Hybridization and PCR. *Appl Environ Microbiol.* 63: 4. 1268–1273.
- LeBlanc J. G., Milani C., de Giori GS., Sesma F., van Sinderen D., and Ventura M. (2013). Bacteria as vitamin suppliers to their host: A gut microbiota perspective. *Current Op Biotech*, 24, 160–168. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.08.005>
- Ley RE., Bäckhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C. A., Knight, R. D., & Gordon, J. I. (2005). Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(31), 11070-11075.
- Ley, RE., Turnbaugh, P. J., Klein, S. & Gordon, J. I. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444, 1022–1023 (2006).
- Ley RE., Hamady M., Lozupone C., Turnbaugh PJ., Ramey RR., Bircher JS., Schlegel M., Tucker TA., Schrenzel MD., Knight R. and Gordon JI. (2008). Evolution of Mammals and Their Gut Microbes. *Science*, Vol 320. 1647-1651.
- Mackie RI., 2002. Mutualistic fermentative digestion in the gastrointestinal tract: diversity and evolution. *Integr. Comp. Biol.* 42, 319–326.



<https://doi.org/10.1093/icb/42.2.319>.

Marsh LK., Cuarón A.D., Cortés-Ortiz L., Shedden A., Rodríguez-Luna E. and de Grammont PC. (2008). *Alouatta pigra*. The IUCN Red List of Threatened Species.e.T914A13094441.

<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T914A13094441.en>

Milton K. (1980). *The Foraging Strategy of Howler Monkeys: A Study in Primate Economics*. New York: Columbia University Press.

Nelson T. (2012). *Factors Influencing the Gut Microbiota of Antarctic Seals*. Thesis for the degree of Doctor of Philosophy. Evolution & Ecology Research Centre School of Biological, Earth & Environmental Sciences University of New South Wales, Sydney, Australia.

Obregón-Tito AJ., Tito RY., Metcalf J., Sankaranarayanan K., Clemente JC., Ursell LK., Xu ZZ, Van Treuren W., Knight R., Gaffney PM., Spicer P., Lawson P., Marin-Reyes L., Trujillo-Villaruel O., Foster M., Guija-Poma E., Troncoso-Corzo L., Warinner Ch., Ozga AT. and Lewis CM. (2015). Subsistence strategies in traditional societies distinguish gut microbiomes. *Nature communications* | 6:6505 | DOI: 10.1038/ncomms7505 | [www.nature.com/naturecommunications](http://www.nature.com/naturecommunications).

Oksanen J. (2011). *Multivariate analysis of ecological communities in R: vegan tutorial*. R package version, 1(7), 1-43.

Palmer C., Bik EM., Di Giulio DB., Relman DA. and Brown PO. (2007). Development of the Human Infant Intestinal Microbiota. *PLoS Biol* 5(7): e177. doi: 10.1371 /journal. pbio. 0050177.

Pastor\_Nieto R. (2015). *Health and Welfare of Howler Monkeys in Captivity*. En Kowalewski (eds.), *Howler Monkeys, Developments in Primatology: Progress and Prospects*; Chapter 12, Pp 313-355.

Pérez-Gil R., Jaramillo MF., Muñiz SAM. and Torres GM. (1996). *Proyecto de importancia económica de los vertebrados silvestres de México*. CONABIO. México. D. F. 215pp.

- Pozo-Montuy G. and Serio-Silva JC. (2007). Movement and resource use by a group of *Alouatta pigra* in a forest fragment in Balancán, México. *Primates* 48: 102.
- Shapira M. (2016). Gut Microbiotas and Host Evolution: Scaling Up Symbiosis Trends in Ecology & Evolution, July 2016, Vol. 31, No. 7. 539-549.
- SEMARNAT. (2010). Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010.
- Serio-Silva JC., Rico-Gray V. (2002). Interacting of forest fragmentation and howler monkey foraging on germination and dispersal of fig seeds. *Oryx, Int J Conserv* 36 (3): 266-271.
- Servicio Meteorológico Nacional (SMN), México. <https://www.gob.mx/smn>. Accessed October 03, 2019.
- Stevenson PR (2000). Seed dispersal by woolly monkeys (*Lagothrix lagotricha*) at Tinigua National Park, Colombia: Dispersal distance, germination rates, and dispersal quantity. *Am J Primatol* 50: 275-289.
- Tremaroli V. and Bäckhed F. (2012). Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*, 489(7415), 242-249.
- Van Schaik C. P., Terborgh JW. and Wright SJ. (1993). The phenology of tropical forests: adaptive significance and consequences for primary consumers. *Annual Review of ecology and Systematics*, 24(1), 353-377.
- Vásquez-Aguilar AA., Toledo-Manuel FO., Barbachano-Guerrero A. and Hernández-Rodríguez D. (2020). Detection of Antimicrobial Resistance Genes in *Escherichia Coli* Isolated from Black Howler Monkeys (*Alouatta pigra*) and Domestic Animals in Fragmented Rainforest Areas in Tabasco, Mexico. *Journal of Wil Life Diseases*. 4(1), 00-00.
- West AG., Waite DW., Deines P., Bourne DG., Digby A., McKenzie VJ., and Taylor, MW. (2019). The microbiome in threatened species conservation. *Biological conservation*, 229, 85-98.

Zoetendal EG., Cheng B., Koike S. and Mackie RI. (2004). Molecular microbial ecology of the gastrointestinal tract: from phylogeny to function. *Current issues in intestinal microbiology*, 5(2), 31-48.

# Supplementary

**Supplementary Table 1.** Feeding frequency per plant species

Site	Plant species consumed (Scientific name)	Plant species consumed (common name)	Frequency / Seasons			Total
			Dry	Rainy	Nortes	
RSV	<i>Albizia leucocalyx</i>	Caracolillo	1	4	5	10
RSV	<i>Ficus sp1.</i>	Higuera	1	1	-	2
RSV	<i>Guazuma ulmifolia</i>	Guásimo	1	1	2	4
RSV	<i>Haematoxylon campechianum</i>	Tinto	2	2	2	6
RSV	<i>Inga eduli</i>	Vicks	3	-	3	6
RSV	<i>Lysiloma microphyllum cf.</i>	Cantemoc	3	1	3	7
RSV	<i>Machaerium sp.</i>	---	3	-	-	3
RSV	<i>Malvaviscus arboreus cf.</i>	Chocho	1	-	1	2
RSV	<i>Pithecellobium lanceolatum</i>	Tucuy	8	9	8	23
RSV	<i>Psidium guajava</i>	Guayabo	1	4	-	5
RSV	<i>Sabal mexicana</i>	Guano	-	3	4	7
RSV	<i>Tabebuia rosea</i>	Maculí	-	2	2	4
SVUC	<i>Albizia leucocalyx</i>	Caracolillo	9	6	8	23
VSBC	<i>Guazuma ulmifolia</i>	Guasimo	6	2	5	13
VSBC	<i>Pithecellobium lanceolatum</i>	Tucuy	-	4	2	6
VSBC	<i>Tabebuia rosea</i>	Maculí	4	5	2	11
VSBC	<i>Muntigia calabura</i>	Capulín	2	1	-	3
VSBC	<i>Maclura Tinctoria</i>	Moral	-	3	-	3

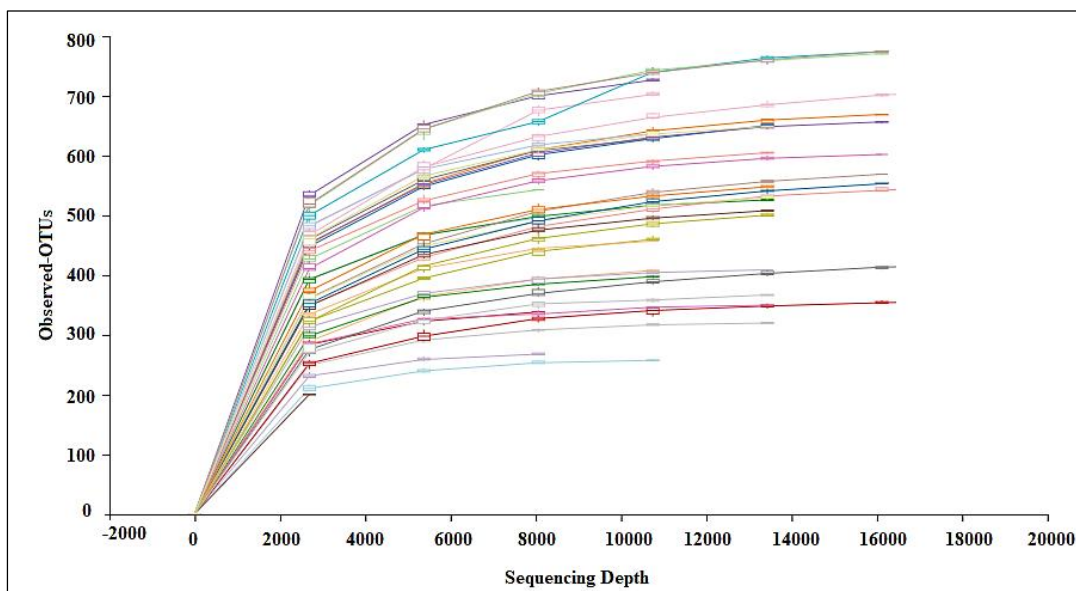
**Supplementary Table 2.** Kruskal-Wallis (pairwise) diversity significance test between wild and captive howler monkeys

Site 1	Site 2	H	p-value	q-value
BCLR (n=5)	RSV (n=17)	6.88849105	0.00867525	0.02602574
BCLR (n=5)	SVUC (n=14)	5.35714286	0.02063756	0.03095634
BCLR (n=5)	YMK (n=4)	0.24	0.62420612	0.74904734
RSV (n=17)	SVUC (n=14)	0.00630252	0.93672368	0.93672368
RSV (n=17)	YMK (n=4)	7.21925134	0.00721258	0.02602574
SVUC (n=14)	YMK (n=4)	5.45864662	0.01947172	0.03095634

**Supplementary Table 3.** Kruskal-Wallis (pairwise) diversity significance by seasons

Season 1	Season 2	H	p-value	q-value
Dry (n=11)	Nortes (n=11)	10.5652174	0.00115235	0.00345706
Dry (n=11)	Rainy (n=8)	6.13636364	0.01324294	0.01986441
Nortes (n=11)	Rainy (n=8)	4.26136364	0.03898861	0.03898861

**Supplementary Figure 1. Rarefaction curves**



**D) Interacción de monos aulladores negros (*Alouatta pigra*) y fauna ganadera que cohabitan en una región del sureste mexicano. Implicaciones en la estructura del microbioma.**

# **Interacción de monos aulladores negros (*Alouatta pigra*) y fauna ganadera que cohabitan en una región del sureste mexicano. Implicaciones en la estructura del microbioma.**

## **Introducción**

### *Interacción entre fauna silvestre y doméstica*

Para la fauna silvestre la interacción con especies no nativas, por ejemplo, la fauna doméstica y ganadera, es cada vez más común y puede influir en la composición de su microbioma, pues se sabe que la convivencia entre especies diferentes crea una red de conexiones dinámicas que permite el intercambio de microorganismos e incluso aumenta la probabilidad de aparición de nuevos patógenos (Rhyan and Spraker, 2007).

Cabe mencionar que esta interacción no implica solamente un contacto directo entre especies, si no que incluye también un contacto indirecto a través del suelo, pastos, agua, u otros espacios en los que un animal ha estado en contacto reciente y ha dejado rastros de cualquier secesión biológica; incluso se han considerado los insectos u otros organismos intermediarios como parte de esta interacción (Kock, 2005). Inclusive, se ha sugerido que la presencia de patógenos externos puede darse por convivencia con otras especies, aunque se desconocen los efectos que éstos puedan causar sobre todo en fauna silvestre (Bengis *et al.* 2002, Vásquez- Aguilar *et al.*, 2020).

Algunas investigaciones señalan que el intercambio de bacterias no es necesariamente perjudicial, por el contrario, señalan que la microbiota local podría facilitar la adaptación de nuevas especies de bacterias e incluso beneficiarse de contribuciones aditivas e intercambios con microorganismos externos (Shapira, 2016).

### *Papel de la fragmentación del hábitat en las interacciones silvestres-domésticos*

Debido a las condiciones de destrucción y fragmentación del hábitat en México, numerosas especies son más sensibles a la interacción con especies no nativas, particularmente fauna doméstica y ganadera en espacios con influencia antropogénica. Esto no es excepción para el mono aullador negro (*Alouatta pigra*) de la región de Balancán, Tabasco, México, donde la convivencia con fauna doméstica es cada vez mayor debido al crecimiento de asentamientos humanos (Pozo Montuy and Serio-Silva, 2006).

Diversos estudios en esta zona realizados en los últimos 15 años señalan que hay una influencia de las condiciones de fragmentación del hábitat en este sitio, las cuales pueden limitar significativamente la disponibilidad de alimentos en los rangos domésticos de los monos aulladores (Estrada and Coates-Estrada 1996), obligando a estos primates a migrar entre fragmentos de selva (Mandujano *et al.* 2004; Bennett, 2004), y provocando que estas especies con hábitos arbóreos desciendan de los árboles para moverse de fragmento en fragmento a través de los potreros o áreas de cultivo.

Algunos estudios realizados en hábitats fragmentados con monos aulladores (*A. palliata*) han clasificado estas conductas como comportamientos inusuales, que incluyen mayor tiempo de locomoción y forrajeo en el suelo (Glander, 1992; Horwich and Lyon, 1998; Clarke *et al.* 2002).

A pesar de esta oportunidad de interacción de animales silvestres con domésticos en un espacio perturbado por el hombre, pocas veces se ha considerado incluir el elemento microbiota dentro de una evaluación para ver como impacta esta perturbación a la red de interacciones entre estos elementos. Es así que en el presente estudio se pretende identificar la composición del microbioma que poseen los monos aulladores negros (*A. pigra*) dependiendo de tres condiciones de colecta: a) monos aulladores en vida libre cohabitando con fauna ganadera; b) monos en vida libre sin exposición a fauna ganadera; y c) monos cautivos de la misma especie sin exposición a otras especies, y con base en ello inferir si a la convivencia de los monos aulladores negros silvestres con fauna ganadera pudiera ser un factor que modifica el microbioma de esta especie de monos.

## **Métodos**

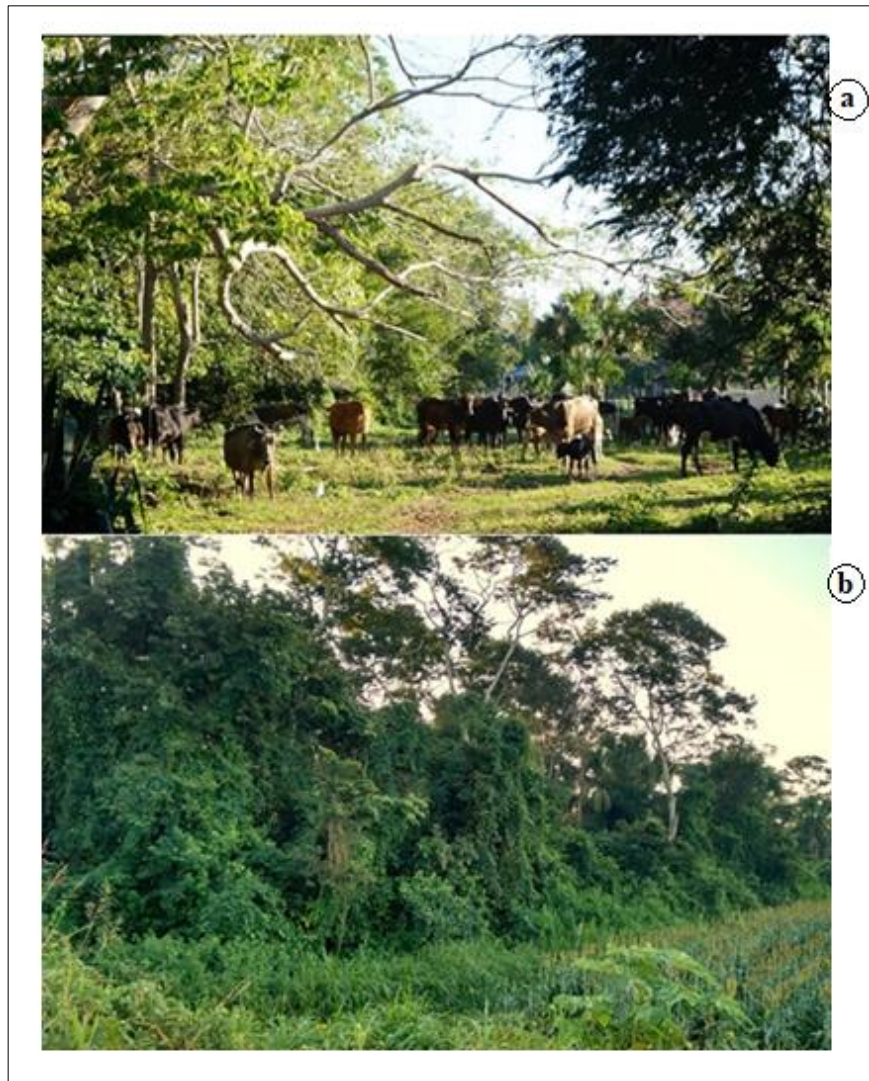
### *Sitio de Estudio*

El estudio se realizó en la localidad "Josefa Ortiz de Domínguez", en la cuenca del río Usumacinta, en el municipio de Balancán, Tabasco, México (17 ° 46'48.46 " N y 91 ° 30'22.11 "W). Esta área es parte de un paisaje altamente fragmentado, en donde la vegetación original ha sufrido una degradación severa desde hace varios años, perdiendo alrededor del 80% de su cobertura original debido a actividades antropogénicas, principalmente la ganadería y la agricultura.

Debido a las prácticas agropecuarias, se ha registrado la presencia en la zona de animales domésticos como cerdos, cabras, ovejas, vacas y perros que comparten el hábitat con los monos aulladores y otras especies silvestres (Jarquín *et al.*, 2015, Aristizabal *et al.*, 2017).



Los sitios de colecta se encuentran separados por aproximadamente 4 km y presentan diferentes características: el primer sitio está catalogado como vegetación secundaria ribereña (RSV, por sus siglas en inglés), es un área inundable con actividad ganadera (Figura 1a), el segundo sitio es una región con menor grado de perturbación rodeada de campos agrícolas en la que no se reporta presencia de ganado dentro del fragmento (Figura 1b), esta ha sido catalogada como vegetación secundaria bajo conservación (SVUC, por sus siglas en inglés).



**Figura 1.** Sitios de muestreo, Balancán, Tabasco. **a)** Sitio RSV (Riparian Secondary Vegetation), un fragmento de selva, hábitat natural de los monos aulladores negros que ha sido modificado para el pastoreo de ganado bovino, asnar, equino, ovino y caprino. **b)** Sitio SVUC (Secondary Vegetation Under Conservation), fragmento de selva en donde habita una de las tropas de monos muestreada, está rodeado por campos de cultivo de sorgo, en este sitio no se registra la presencia de fauna doméstica.

### *Sujetos de estudio*

El estudio se llevó a cabo con dos tropas de monos aulladores negros en vida libre (*Alouatta pigra*), dos grupos de monos aulladores negros en cautiverio y cinco especies de fauna ganadera (*Bos Taurus*, *Equus caballus*, *Equus asinus*, *Ovis aries* y *Capra aegagrus hircus*) (Tabla 1). Las muestras de fauna ganadera se tomaron sólo de aquellos individuos en los que se observó su presencia directa en la misma área en la que se encontraban los monos aulladores, al ser una “n” pequeña de cada especie se agruparon y se consideraron como un solo grupo.

**Tabla 1.** Grupos de estudio

<b>Grupo</b>	<b>Especie</b>	<b>No. de sujetos</b>	<b>Características</b>
RSV	<i>A. pigra</i>	6	Monos silvestres en cohabitación con fauna ganadera
SVUC	<i>A. pigra</i>	6	Monos silvestres sin contacto con fauna ganadera
YMK	<i>A. pigra</i>	4	En cautiverio
BCLR	<i>A. pigra</i>	5	En cautiverio
Fauna ganadera	<i>Bos Taurus</i>	2	Zona de pastoreo en el hábitat de monos silvestres del sitio RSV.
	<i>Equus caballus</i>	2	
	<i>Equus asinus</i>	2	
	<i>Ovis aries</i>	1	
	<i>Capra aegagrus hircus</i>	1	

### *Toma de muestras*

En el período comprendido entre marzo de 2016 y enero de 2017, se recolectaron muestras fecales frescas, inmediatamente después de su deposición, de monos aulladores negros y animales domésticos. Se colectó una porción de heces frescas (5–10 g) de cada mono aullador negro y de cada ejemplar de las cinco especies de ganado y se colocaron en un tubo estéril con etanol al 99%. Las muestras se mantuvieron almacenadas a una temperatura de 4 ° C hasta la extracción de ADN para análisis moleculares posteriores.

### *Extracción de DNA y Análisis moleculares*

La extracción del DNA de las muestras se realizó utilizando el kit ZR fecal DNA Mini Prep (Zymo Research® CA, EE. UU.), siguiendo las especificaciones del fabricante. La concentración y la

calidad del DNA extraído fue medido por medio de un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) y se realizó una PCR para amplificar la región V9 del gen 16S ARN ribosomal utilizando los primers Lm3 (5'-CGGGTGCTTcCCCACTTTTCATG-3') y Lm26 (5'-GATTCTGGCTCAGGATGAACG-39) diseñados por Kaufmann *et al.* (1997) que amplifican un fragmento de 1,35 kb. Las condiciones de la PCR consistieron en 35 ciclos de 94 °C (1 min), 60 °C (15 s), 72 °C (4 min) con una extensión final de 72 °C (10 min).

Una vez realizada la cuantificación del DNA y realizada la PCR para corroborar la amplificación de un gen, las muestras de DNA fueron enviadas para su secuenciación al Integrated Microbiome Resource (IMRI) en la Universidad Dalhousie, Nova Scotia, Canadá. Las muestras se secuenciaron usando Illumina MiSeq y la elaboración de las librerías fue con Nextera Flex de Illumina, Inc. California, Estados Unidos. Las muestras secuenciadas fueron analizadas usando el programa bioinformático Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME 2 v.2019.4) descrito por Caporaso, (2017).

Las lecturas crudas fueron limpiadas y se unieron mediante fastq-join y, posteriormente se filtraron por calidad, se eliminaron las secuencias que contenían longitudes de lectura inferiores a 400 pb y se clasificaron en taxones utilizando la base de datos de genes de rRNA Greengenes 16S.

Los análisis de diversidad se llevaron a cabo mediante la comparación de las Unidades taxonómicas operativas u OTUs (del inglés Operational Taxonomic Unit) entre los diferentes grupos de estudio.

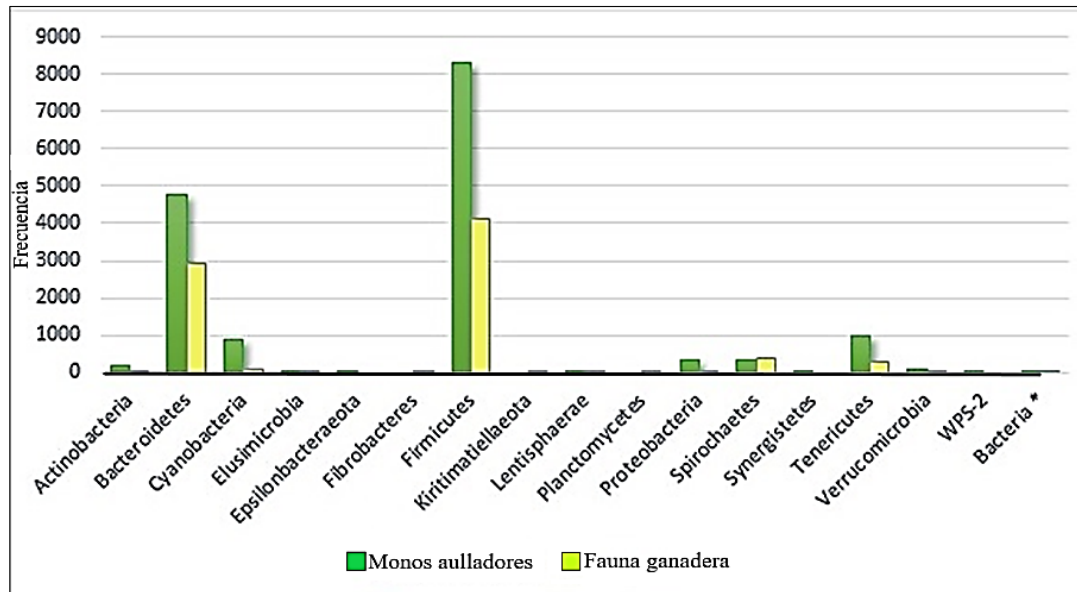
La diversidad alfa se calculó a través del índice de Shannon y la diversidad beta de la estructura de la comunidad bacteriana se midió mediante el análisis de coordenadas principales (PCoA) dadas por distancias de Bray Curtis y Jaccard.

Para conocer si existían diferencias entre el número de OTUs en los diferentes grupos de estudio se realizó una prueba de Kruskal-Wallis. Posteriormente se aplicó una prueba Mann-Whitney para conocer entre que grupos se presentaba la diferencia entre el número OTUs. Ambas pruebas se realizaron mediante el programa PAST (PAleontological STatistics), versión 3.25. (Hammer, 2019)

## **Resultados**

Cada grupo, tanto los monos como la fauna ganadera presentaron 14 *phyla*; tres de ellos se encontraron sólo en los monos (Epsilonbacteraeota, Synergistetes y WPS-2). Por otro lado,

Fibrobacteres, Kiritimatiellaota y Planctomycetes se encontraron presentes en especies de ganado. En los monos aulladores, encontramos que las OTUs principales están representadas por los *phyla* Firmicutes, Bacteroidetes y Tenericutes con una mayor proporción de Cianobacterias, Proteobacterias y Actinobacterias (Figura 2).



**Figura 2.** Representación gráfica de los *phyla* bacterianos en monos aulladores y fauna ganadera. En los dos grupos dominaron los mismos *phyla* (Firmicutes, Bacteroidetes y Tenericutes), aunque se puede ver una mayor proporción en los monos aulladores. Tres *phyla* se encontraron sólo en monos (Epsilonbacteraeota, Synergistetes y WPS-2) y tres sólo en fauna doméstica (Fibrobacteres, Kiritimatiellaota y Planctomycetes). \* Grupo bacteriano no identificado.

Se encontraron diferentes proporciones en las familias Lachnospiraceae y Ruminocacceae, que en general eran más diversas y abundantes en los monos aulladores en vida libre (Tabla 2).

**Tabla 2.** Proporción de las familias Ruminocacceae y Lachnospiraceae.

	Monos <sup>1</sup> RSV	Monos <sup>1</sup> SVUC	Monos <sup>2</sup> BCLR	Monos <sup>2</sup> YMK	Fauna ganadera
Ruminocacceae	35.8%	32.9%	19.5%	12.3%	28.1%
Lachnospiraceae	14.8%	15.2%	6.9%	7.2%	4.3%

<sup>1</sup>Vida libre, <sup>2</sup>Cautiverio

Por otro lado, los monos aulladores tuvieron una proporción del 2% del género *Faecalibacterium*, mientras que en la fauna ganadera estaba ausente. *Anaerostipes*, también se encontró solo en monos aulladores, pero en una proporción menor (0.6%).

Se encontraron algunas diferencias importantes a nivel de género, por ejemplo, *Alistipes* se encontró en proporciones de alrededor del 6% en la fauna ganadera, mientras que en los monos su proporción fue del 0.3%. Otro género comúnmente reportado en el ganado (*Prevotella* UCG004) y un género parcialmente identificado y reportado para el grupo de las termitas (M2PB4-65) también se encontró en monos aulladores, pero en una proporción inferior al 0,05%.

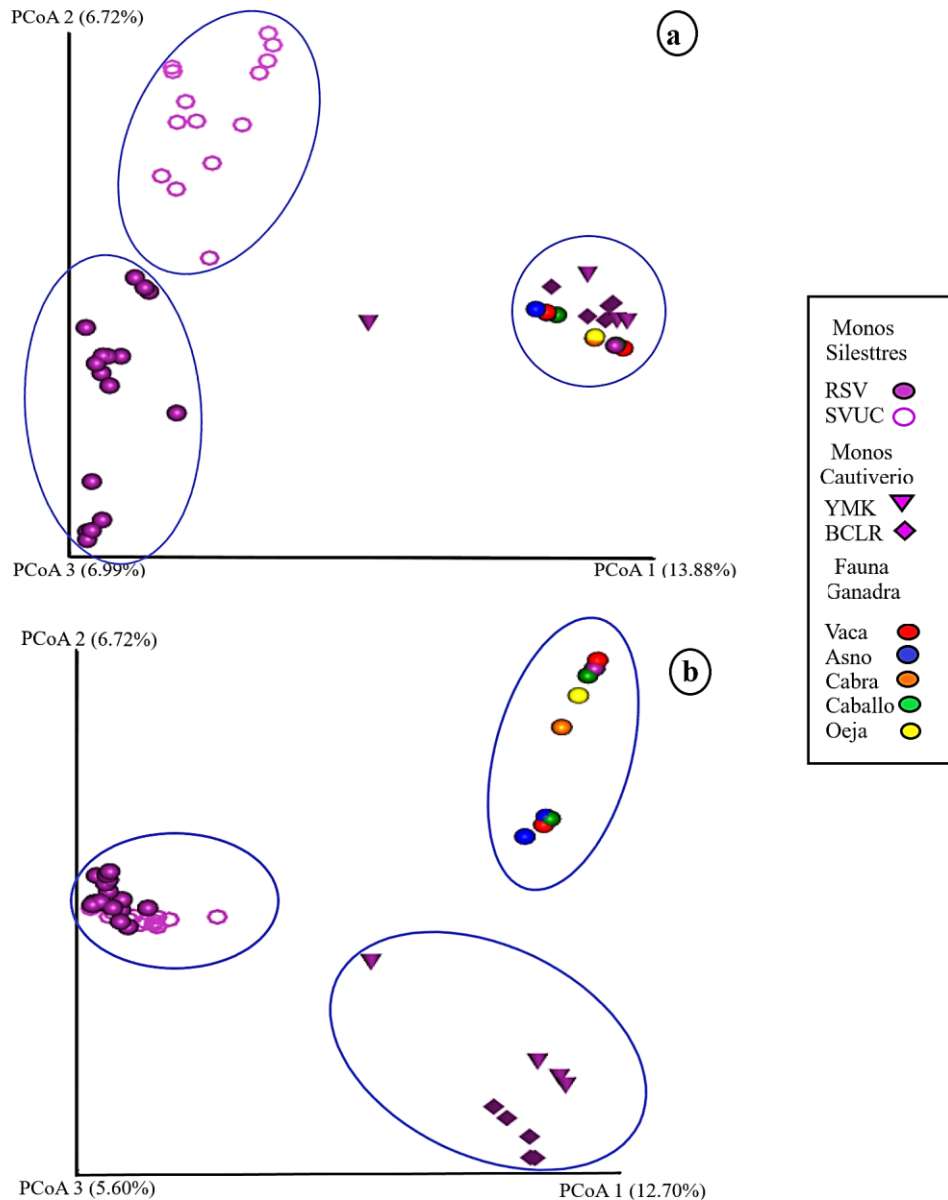
La diversidad bacteriana dada por el índice de Shannon para los monos aulladores en vida libre fue de 7.4, mientras que para los monos en cautiverio fue de 6.6 mientras que para la fauna ganadera fue de 7.9.

El cambio en la composición bacteriana entre las muestras analizadas de monos y fauna ganadera (diversidad beta), mostró una agrupación por separado de los monos en la vida libre, monos en cautiverio y también de la fauna ganadera

Las diferencias en la composición del microbioma entre los monos en diferentes condiciones de hábitat y la fauna doméstica se pueden observar en el análisis de PCoA de Bray Curtis, en donde el PCoA 1 representó el 13.88% de las diferencias. Aquí se aprecia una tendencia a la agrupación entre grupos de monos en vida libre, grupos de monos cautivos y fauna ganadera (Figura 3a). También se puede observar una aproximación entre los grupos de fauna ganadera y los monos aulladores de cautiverio.

Al comparar las OTU entre especies de cada sitio, por medio de la distancia Jaccard, se refleja una agrupación más compacta entre los grupos de monos en la vida libre, sin embargo, la tendencia a separarse de la fauna doméstica y de cautiverio se mantiene. Aquí el PCoA 1 marcó el 12.7 de las diferencias en la estructura de las comunidades bacterianas entre los grupos (Figura 3b). Esta diversidad comparativa denota diferentes OTUs dominantes en cada grupo.

La prueba de Kruskal-Wallis mostró que existen diferencias significativas entre número de OTUs ( $H= 19.94$ ,  $p < 0.001$ ). El número de OTUs encontrados fue significativamente diferente entre los monos en vida libre y los de cautiverio (Mann-Whitney:  $p < 0.001$ ), y entre los monos en cautiverio y la fauna ganadera (Mann-Whitney:  $p < 0.002$ ), mientras que entre los monos de vida libre y la fauna ganadera no hubo esta diferencia significativa (Mann-Whitney:  $p= 0.47$ ).



**Figura 3.** Matrices de distancia. a) Distancia de Bray Curtis, se observa una separación entre los grupos de monos en vida libre respecto a los de cautiverio y especies de fauna ganadera. b) Distancia de Jaccard se observa una asociación en tres grupos, uno conformado por los dos grupos de monos aulladores en vida libre, otro con los dos grupos de monos aulladores en cautiverio y un tercero que agrupa las especies de fauna ganadera.

## Discusión

Una de las características que distinguen nuestro estudio es el alto grado de perturbación en el que viven los monos aulladores de la región de Balancán, México, particularmente en el sitio del RSV, que está más perturbado y por incluir la presencia de fauna ganadera dentro del hábitat.

Es por esto que hemos considerado la importancia del estudio de la transmisión y el flujo de microorganismos entre la fauna ganadera y los monos aulladores silvestres de la región de Balancán, así como su efecto en el microbioma de los monos. Aquí hemos analizado las características del microbioma intestinal de los monos aulladores negros silvestres y cautivos y de un grupo diverso de fauna ganadera que incluye vacas, caballos, asnos, ovejas y cabras.

Las diferencias observadas entre los grupos a nivel de análisis de diversidad pueden indicar simplemente que la variación importante en las comunidades microbianas radica en las diferencias genéticas y fisiológicas específicas de la especie. Sin embargo, los grupos bacterianos compartidos podrían ser la clave para inferir si el contacto cercano entre el ganado y los monos aulladores puede significar un intercambio bacteriano.

Debido a que son especies diferentes, se esperaba encontrar diferencias marcadas incluso a los niveles taxonómicos más altos como *phylum*. Nosotros pudimos ver que tres *phyla* se encontraban únicamente en monos aulladores y tres eran exclusivos del ganado. Estos *phyla* ya habían sido reportados para cada especie en trabajos previos (por ejemplo, Amato, *et al.*, 2013, Myer, *et al.*, 2015).

Los estudios que buscan la posibilidad de intercambio bacteriano entre especies silvestres y domésticas se han basado en la búsqueda de marcadores específicos, como los genes de resistencia a los antimicrobianos (Van den Honert *et al.*, 2018; Vásquez-Aguilar *et al.*, 2020) o asociaciones genéticas en especies bacterianas específicas como *E. coli* o *Salmonella spp.* (Goldberg *et al.*, 2008; Kagambega *et al.*, 2013; Rwego *et al.*, 2008), pero no en estudios comparativos del microbioma, tal vez, debido a la complejidad que esta comparación implica por tratarse de especies diferentes.

Como se ha señalado anteriormente, se encontraron diferencias a nivel de género, por ejemplo, *Alistipes* que se encontró en proporciones de alrededor del 6% en la fauna del ganado, mientras que en los monos la proporción fue del 0.3%. *Alistipes* se ha descrito como una bacteria comensal para el intestino humano y, en cantidades limitadas, son consideradas como indicativas de buena salud gastrointestinal, en humanos está reportada como un importante por su actividad proteolítica (Korpela, 2018), y aunque no se considera patógeno, ocasionalmente también se ha asociado con dolor abdominal en niños (Shkoporov *et al.*, 2015).

Los monos tenían un 2% de *Faecalibacterium*, mientras que en la fauna ganadera de este estudio estaba ausente. Esta bacteria productora de butirato se ha descrito en estudios con humanos y se ha correlacionado negativamente con el estado de disbiosis y los procesos inflamatorios (Haro

*et al.*, 2016). *Faecalibacterium* degrada la fibra vegetal produciendo ácido butírico, que representa la principal fuente de energía para las células epiteliales del colon (Schnorr *et al.*, 2014).

Aunque *Prevotellaceae* UCG004, han sido descritas como bacterias comunes en el tracto ruminal, su función aún no está claramente determinada, pero se le han atribuido propiedades celulolíticas y se sugiere una diversidad funcional significativa de estas bacterias en el rumen, posiblemente por una participación de diversos grupos de *Prevotella* en la degradación del alimento en el rumen, particularmente el heno (Bekele *et al.*, 2010). Su presencia en la MBI de los monos podría asociarse también con una función celulolítica, aunque su proporción es muy baja en comparación con otros OTUs bacterianos con la misma función.

La diferencia más marcada se encontró en las familias Lachnospiraceae y Ruminocoaceae, que en general eran más abundantes y con géneros más diversos en los monos en vida libre. Se sabe que estos taxones son activos en la producción de acetato, formiato e hidrógeno y si bien son grupos diversos, comparten un importante papel común como degradadores activos de plantas (fibrolíticos) y se han asociado con el mantenimiento de la salud intestinal (Biddle *et al.*, 2013).

Como señala Holscher (2017), una dieta folívoro-fugívora como la de los monos aulladores que contiene altas cantidades de hemicelulosa, pectinas, gomas, fructanos y almidones resistentes, es más compatible con la variada comunidad microbiana gastrointestinal y la abundancia de Lachnospiraceae y Ruminocacceae, en comparación con una dieta que tiene una carga de sustrato menos diversa como la consumida por el ganado y por los monos en cautiverio. En estos últimos, su dieta es basada en una diversidad de ingredientes que incluye alimentos balanceados, suplementos vegetales y frutos que, si bien satisfacen sus requerimientos nutricionales, difieren de la dieta que tendrían en vida libre.

En los análisis de diversidad beta, que representa el grado de cambio o reemplazo en la composición de especies microbianas entre diferentes comunidades, se observó que los grupos de aulladores en vida libre se agrupan por separado de los monos en cautiverio y también de la fauna ganadera. Particularmente las distancias representadas por Bray Curtis nos indican que los grupos de vida libre tienen disimilitudes cuantitativas en su comunidad bacteriana (número de OTUs). Se observó una mayor diferenciación en la proporción que presentan la fauna ganadera y los monos en cautiverio. También se observa que la fauna ganadera y los monos en cautiverio tienen proporciones más semejantes en la cantidad de OTUs que los conforman.



Por otro lado, las distancias de Jaccard indican que ambos grupos de monos en vida libre se conforman por comunidades microbianas semejantes y difieren claramente de las que se presentan en los monos de cautiverio y en la fauna ganadera respectivamente. Al mismo tiempo podemos observar que todas las especies de ganado se agrupan juntas, lo que indica que están conformadas por OTUs bacterianos semejantes.

La agrupación entre monos de vida libre representa OTUs bacterianos compartidos entre estos grupos que tienen dietas más semejantes (Hernández-Rodríguez and Serio-Silva 2020); del mismo modo, la disimilitud mostrada con los monos en cautiverio se relaciona con la dieta de cautiverio que incluye ingredientes que los monos no consumen en su hábitat natural y que contribuye a la modificación de su microbioma como se ha mostrado en estudios previos (por ejemplo Amato *et al.*, 2013; Clayton, *et al.*, 2016).

Los datos obtenidos no muestran un claro indicio de que el microbioma de los monos aulladores sea afectado por cohabitar con fauna ganadera, sin embargo, tampoco se puede descartar que haya intercambio bacteriano interespecies. Un estudio reciente realizado en la misma región demuestra la presencia de genes de resistencia a antimicrobianos en estos monos aulladores, que también se encontraron en el ganado con el que comparten hábitat (Vásquez-Aguilar *et al.*, 2020).

Si bien podría pensarse que el contacto entre los monos aulladores y el ganado es poco probable debido a los hábitos arbóreos de *A. pigra*, los comportamientos atípicos como caminatas por el suelo o cercas para moverse entre fragmentos, así como el consumo de agua en las fuentes o huecos de los troncos que se presentan en esta área debido a su alto grado de perturbación (Pozo-Montuy and Serio-Silva, 2007), favorecen un contacto más estrecho con el ganado y/o sus residuos biológicos.

Anteriormente se ha informado sobre la posibilidad de adquisición de bacterias en primates salvajes a través del desperdicio de alimentos humanos, el contacto con otras especies, tierra, heces o agua contaminada (Tegner *et al.*, 2019). Por lo tanto, debido a las características del hábitat de los monos RSV, que favorecen la interacción con diferentes especies de fauna ganadera, es posible la adquisición de bacterias del ganado por los monos. Sin embargo, debe considerarse que la exposición a las bacterias del ganado no implica necesariamente una transmisión o, en cualquier caso, su establecimiento en el microbioma de los monos y que, aunque se produjera contacto, la posibilidad de modificación del microbioma para que sus características sean cercanas al ganado

sería un proceso que involucraría diversos factores además de un largo período de tiempo y/o una exposición constante.

Finalmente, los datos obtenidos nos muestran que pese a la cercanía con el ganado y a las posibles interacciones que puedan existir entre las especies, el microbioma de los monos se mantiene intacto y no sufre modificaciones por ese factor. No así en el caso del cautiverio, en donde es notoria la modificación que se presenta en el microbioma de los monos en estas condiciones.

## **Conclusiones**

Con los datos obtenidos en este estudio, podemos concluir que la dieta juega el papel principal como modulador del microbioma intestinal y que, a pesar de compartir el mismo hábitat, la presencia de ganado no parece afectar la composición del microbioma de los monos aulladores silvestres.

Por otra parte, si bien no se observó una clara transmisión de bacterias entre ganado y monos silvestres, éste estudio puede sentar un precedente para considerar la presencia de fauna ganadera como un factor potencial que puede alterar la estructura microbiana de los monos aulladores en sitios perturbados y en donde estén en estrecha relación con animales domésticos y decretar los efectos que este intercambio microbiano puede significar para los monos aulladores u otras especies de fauna silvestre.

## Referencias

- Amato KR., Yeoman CJ., Kent A., Righini N., Carbonero F., Estrada A., Gaskins H., Stumpf RM., Yildirim S., Torralba M., Gillis M., Wilson BA., Nelson KE., White BA. and Leigh SR. (2013). Habitat degradation impacts black howler monkey (*Alouatta pigra*) gastrointestinal microbiomes. *The ISME J* 7, 1344–1353.
- Aristizabal JF., Rothman, JM., García-Fería, LM., and Serio-Silva, JC. (2017). Contrasting time-based and weight-based estimates of protein and energy intake of black howler monkeys (*Alouatta pigra*). *American journal of primatology*, 79(4), 1-8.
- Bekele AZ., Koike, S., and Kobayashi, Y. (2010). Genetic diversity and diet specificity of ruminal *Prevotella* revealed by 16S rRNA gene-based analysis. *FEMS microbiology letters*, 305(1), 49-57.
- Bengis RG., Kock, RA., and Fischer, J. (2002). Infectious animal diseases: the wildlife/livestock interface. *Revue Scientifique et Technique-Office international des épizooties*, 21(1), 53-66.
- Biddle A., Stewart, L., Blanchard, J., and Leschine, S. (2013). Untangling the genetic basis of fibrolytic specialization by Lachnospiraceae and Ruminococcaceae in diverse gut communities. *Diversity*, 5(3), 627-640.
- Caporaso JG. (2017). Quantitative insights into microbial ecology (QIIME) 2. <https://qiime2.org>.
- Clayton JB., Vangay P., Huang H., Ward T., Hillmann BM., Al-Ghalith GA., Travis DA., Long HT., Van Tuan B., Van Minh V., Cabana F., Nadler T., Toddes B., Murphy T., Glander T., Johnson TJ. and Knights D. (2016). Captivity humanizes the primate microbiome. *PNAS*; 113:37, 10376–10381.
- Estrada A. and Coates-Estrada R. (1996). Tropical Rain Forest Fragmentation and Wild Populations of Primates at Los Tuxtlas, México. *Int J Prim*; 17: 5.
- Goldberg TL., Gillespie TR., Rwego IB., Estoff EL. and Chapman CA. (2008). Forest Fragmentation as Cause of Bacterial Transmission among Nonhuman Primates, Humans, and Livestock, Uganda. *Em Infec Dis*. Vol. 14, No. 9, 1375- 1382.
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T., & Ryan, P. D. (2019). *Paleontological statistics*. ver, 3, 25.

- Haro C., Montes-Borrego M., Rangel-Zúñiga OA., Alcalá-Díaz JF., Gómez-Delgado F., Pérez-Martínez P., and López-Miranda J. (2016). Two healthy diets modulate gut microbial community improving insulin sensitivity in a human obese population. *The Journal of Clinical Endocrinology*, 101(1), 233-242.
- Hernández-Rodríguez D. and Serio-Silva JC. (2020). “Éramos muchos y parió la mona”: dieta de *Alouatta pigra* en condiciones de fragmentación en Balancán, Tabasco. *Kuxulkab’*, 26(54): 27-39. DOI: [https:// doi.org/10.19136/Kuxulkab.a26n54.3208](https://doi.org/10.19136/Kuxulkab.a26n54.3208)
- Holscher HD. (2017). Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota *Gut Microbes*. 8(2):172-184
- Jarquín-Díaz VH., Barbachano-Guerrero A., Maldonado-Rodríguez R., Vásquez-Aguilar AA. and Aguilar-Faisal L. (2016). First molecular evidence of *Hepatozoon canis* in domestic dogs and ticks in fragmented rainforest areas in Mexico. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*.
- Kagambèga A., LienemannT., Aulu L., Traoré A., Barro N., Siitonen A. and Haukka K. (2013). Prevalence and characterization of *Salmonella enterica* from the feces of cattle, poultry, swine and hedgehogs in Burkina Faso and their comparison to human *Salmonella* isolates. *BMC Microbiology*, 13:253
- Kock, R. A. (2005). What is this infamous “wildlife/livestock disease interface?” A review of current knowledge for the African continent. *Conservation and development interventions at the wildlife/livestock interface: implications for wildlife, livestock and human health*, 30, 1-13.
- Korpela, K. (2018). Diet, microbiota, and metabolic health: trade-off between saccharolytic and proteolytic fermentation. *Annual Review of Food Science and Technology*. 9:65-84
- Myer PR., Smith TPL., Wells JE., Kuehn LA. and Freetly HC. (2015). Rumen Microbiome from Steers Differing in Feed Efficiency. *PLoS ONE* 10(6): e0129174.

- Pozo-Montuy G. and Serio-Silva JC. (2006). Comportamiento Alimentario de Monos Aulladores Negros (*Alouatta pigra lawrense cebidae*) en Hábitat Fragmentado en Balancán, Tabasco, México. *Acta Zoológica Mexicana* (n.s.) 22 (3): 53-66.
- Rhyan JC. and Spraker TR. (2007). Emergence of diseases from wildlife reservoirs. *Veterinary Pathology* 47(1), 34-39.
- Rwego IB, Isabirye-Basuta G, Gillespie TR, Goldberg TL. 2008. Gastrointestinal bacterial transmission among humans, mountain gorillas, and livestock in Bwindi Impenetrable National Park, Uganda. *Conserv Biol* 22:1600-1607.
- Schnorr SL., Candela M., Rampelli S., Centanni M., Consolandi C., Basaglia G., Fiori J. (2014). Gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers. *Nature communications* 5, 3654.
- Shapira M. (2016). Gut Microbiotas and Host Evolution: Scaling Up Symbiosis Trends in Ecology & Evolution, July 2016, Vol. 31, No. 7. 539-549.
- Shkoporov AN., Chaplin AV., Khokhlova EV., Shcherbakova VA., Motuzova OV., Bozhenko VK., and Efimov BA. (2015). *Alistipes inops* sp. nov. and *Coprobacter secundus* sp. nov., isolated from human faeces. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 65(12), 4580-4588.
- Tegner C, Sunil-Chandra N, Wijesooriya WRPLI ER, Perera BV, Hansson I, Fahlman A. 2019. Detection, Identification, and Antimicrobial Susceptibility of *Campylobacter spp.* and *Salmonella spp.* from Free-Ranging Nonhuman Primates in Sri Lanka. *J Wildlife Diseases* 55:000-000
- Van den Honert MS., Gouws PA. and Hoffman LC. (2018). Importance and implications of antibiotic resistance development in livestock and wildlife farming in South Africa: A Review. *South African Journal of Animal Science*, 48(3), 401-412.
- Vásquez-Aguilar AA., Toledo-Manuel FO., Barbachano-Guerrero A. and Hernández-Rodríguez D. (2020). Detection of Antimicrobial Resistance Genes in *Escherichia Coli* Isolated from Black Howler Monkeys (*Alouatta pigra*) and Domestic Animals in Fragmented Rainforest Areas in Tabasco, Mexico. *Journal of Wil Life Diseases*. 4(1), 00-00.

## **V. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES: LA MICROBIOTA INTESTINAL DE LOS AULLADORES, CANTANDO DESDE SU INTERIOR.**

En este estudio se buscó plantear la importancia del conocimiento del microbioma intestinal para diversos aspectos tanto de la biología, la salud y la conservación del mono aullador negro (*Alouatta pigra*).

### *A) Bifidobacterium y Alouatta, amigos inseparables.*

En un primer plano hemos resaltado la importancia de *Bifidobacterium* como un género de especial relevancia debido a su potencial para mantener un adecuado estado de salud, a su factibilidad para ser manejado y administrado como un producto con propiedades probióticas; además del destacado papel en los procesos digestivos de estos monos debido a su naturaleza mayormente folívora.

En este punto se ha considerado que la importancia de las bifidobacterias para los aulladores está estrechamente relacionada con las grandes cantidades de fibra que incluye su dieta, ya que la fibra juega un papel en todas las funciones del sistema digestivo (Escudero and González, 2006; Milton and McBee, 1983).

La degradación de los carbohidratos derivados de la dieta que el hospedero no puede metabolizar representa una de las formas en que las bifidobacterias aseguran su colonización y persistencia en el intestino. Los carbohidratos no digeribles derivados de la dieta utilizados por las bifidobacterias incluyen oligosacáridos y fibras dietéticas como almidones resistentes, fructanos, pectina, celulosa y hemicelulosa (Bottacini *et al.*, 2017).

Esta estrategia permite la expansión de las capacidades de utilización de carbohidratos por las cepas de bifidobacterias, mientras que los productos finales de sus actividades metabólicas pueden, a su vez, ser utilizados por otros miembros de la comunidad intestinal.

Los principales productos finales del metabolismo de carbohidratos por la fermentación bacteriana son el acetato y el lactato, que se absorben y convierten en butirato en el colon y de esta forma representan una forma de recuperar energía, además de estar implicados en otras funciones beneficiosas para el organismo (Bottacini *et al.*, 2017 , Escudero and González, 2006).

Debido a que los estudios de metagenoma son poco específicos a nivel de género y menos aún de especie, y al interés de conocer qué especies de bifidobacterias están presentes en los monos aulladores, realizamos un estudio de identificación molecular por técnicas de PCR con marcadores

género específicos con los principales géneros de bifidobacterias reportados para humanos (Matsuki *et al.*, 1998; 2002; 2003; Hong and Chen, 2007)

En este trabajo se pudo identificar la presencia de *B. longum*, una especie de bifidobacteria que cuenta con diversos reportes a cerca de los beneficios que provee a su hospedero, por ejemplo, disminución en la severidad de enfermedades gastrointestinales como, diarreas por rotavirus (Park *et al.*, 2017), infecciones por *Clostridium difficile* (Yun *et al.*, 2017) y enfermedades respiratorias causadas por *Klebsiella pneumoniae* (Vieira *et al.*, 2016), entre otras.

Seguramente otras especies de *Bifidobacterias* habitan en el intestino de los monos aulladores, saber quiénes son y qué hacen para contribuir al bienestar de estos monos es una de las siguientes metas de quienes trabajamos en esta área con y por los monos aulladores negros.

#### B) Alimentación de los monos en zonas fragmentadas, ¡aquí se come lo que hay!

La alimentación se define coloquialmente como la acción de ingerir alimentos, sin embargo, sin duda nuestros estudios demuestran que el proceso de alimentación resulta más complejo, inclusive desde la selección de alimentos, condicionada por la disponibilidad de los mismos, hasta los procesos que llevan a su asimilación y aprovechamiento, muchos de ellos, mediados por bacterias intestinales que los ayudan a llevar a cabo estos procesos.

Para los monos aulladores, la alimentación se ha visto afectada por la fragmentación y modificación de su hábitat, esto aunado a los cambios en la disponibilidad que se da de manera natural a través de las diferentes temporadas del año y que ya han sido documentadas en estudios anteriores (Nakamura *et al.*, 2011; Aristizabal, 2013; Amato *et al.* 2015), aunque no en las condiciones extremas de tamaño y modificación de la superficie que nosotros presentamos en este trabajo.

Aún bajo estas condiciones, los resultados obtenidos en cuanto a la preferencia y consumo de ítems alimenticios (hojas maduras, hojas jóvenes, flores, frutos maduros y frutos inmaduros), ésta no varió de forma considerable respecto a los publicado en estudios previos (Aristizabal, 2013).

Los datos de alimentación obtenidos en este estudio concuerdan con lo reportado por otros autores, cuyas observaciones reflejan una dieta mayormente folívora con variaciones temporales relacionadas con la disponibilidad de recursos (Pozo-Montuy, 2006; Aristizabal, 2013).

En todo caso, las variaciones dadas ya sea por modificación del hábitat o por temporalidad, representan para los monos cierta incertidumbre sobre la presencia de frutos, floraciones y

disponibilidad de hojas, lo que va a repercutir en que sean mucho más selectivos en la selección de su alimento.

Aunque podemos decir que los monos aulladores son capaces de adaptarse a condiciones extremas de modificación del hábitat y disponibilidad de recursos, como se ha documentado anteriormente, (Chapman, 1990; Pozo-Montuy and Serio-Silva, 2006), aún no conocemos las implicaciones que esto puede traer a mediano o largo plazo, sobre las poblaciones de los aulladores, y debemos en todo caso, de evitar llevarlos hasta el límite, porque esto puede significar un daño irreversible para las poblaciones de monos aulladores negros.

En nuestro caso en particular, el conocer la dieta de los monos aulladores resulta clave para establecer su relación con grupos de bacterias, principalmente, de aquellas que participan en los procesos de degradación de fibras vegetales.

C) Escuchemos a los que saben. ¿Qué nos dice la microbiota intestinal de los monos aulladores?

La comprensión de los diversos roles del microbioma y su papel potencial en la salud y conservación de la vida silvestre amenazada es motivo de creciente preocupación. Para nosotros es importante enfatizar la importancia de la inclusión del estudio del microbioma en el desarrollo de estrategias de conservación, particularmente en especies que ocupan hábitats perturbados como es el caso de los monos aulladores negros *Alouatta pigra*.

Particularmente consideramos conocer la conformación del microbioma intestinal de los monos aulladores negros que ocupan hábitats en condiciones de fragmentación extrema, disponibilidad limitada de alimentos y que dependen de la variación temporal.

También consideramos el cautiverio como un factor relevante para la conformación del microbioma del mono aullador ya que su dieta incluye ingredientes que no consumen en condiciones naturales.

Anteriormente se han mencionado que los primates en hábitats degradados corren el riesgo de tener una disponibilidad de recursos reducida o limitada y que se refleja en microbiomas disminuidos que podrían afectar su bienestar (Amato, *et al.*, 2013).



Sin embargo, al examinar comparativamente los taxones microbianos intestinales en hábitats con fragmentación extrema, nosotros encontramos que la estrategia de alimentación de los monos aulladores negros puede mediar el efecto alterado del hábitat.

Particularmente los aulladores han sido reportados como una especie relativamente tolerante a la alteración del hábitat (Arroyo and Dias, 2010; Garber *et al.*, 2006; Van Belle and Estrada, 2006), ya que están presentes en parches donde otras especies de primates neotropicales no pueden persistir. (Estrada and Coates-Estrada, 1996; Gilbert, 2003).

Además, nuestros resultados indican que tanto los mecanismos dietéticos como los ambientales contribuyen a los cambios en el microbioma en cautiverio. Estos datos fueron consistentes con investigaciones anteriores (Amato *et al.*, 2015; Clayton *et al.*, 2016).

Las diferencias encontradas en riqueza y diversidad de especies entre los grupos de monos aulladores en cautiverio indican un fuerte impacto de la dieta en la composición microbiana de los monos aulladores.

Varios estudios han documentado cambios en los microbiomas intestinales entre los grupos cautivos y salvajes de especies amenazadas, incluidos los primates no humanos (West, *et al.*, 2019).

Para los monos aulladores el cautiverio representa un gran reto de supervivencia, presentando altas mortalidades de entre 67.6% y 82.3% (Gual-Sill and Rendón-Franco 2011), ahora, podemos considerar que la alteración del microbioma (disbiosis) causado por una dieta atípica puede ser un factor que influya en los altos índices de mortalidad. Sin embargo, aunque los cambios en el microbioma aullador cautivo son evidentes, se necesita más investigación para determinar qué perturbaciones de microbioma representan disbiosis y cuáles son adaptaciones a los cambios en la dieta y el estilo de vida.

Otro aspecto que consideramos en esta investigación fue la conformación microbiana en relación con la variación estacional que se encuentra en el hábitat natural de los monos aulladores de Balancán que marca tres temporadas nortes, lluvias y secas. Es posible que la escasez periódica de recursos haya llevado a la evolución de una amplia gama de adaptaciones morfológicas, conductuales y fisiológicas en consumidores primarios como los monos aulladores. Estas adaptaciones incluyen a la microbiota intestinal y les confieren la flexibilidad necesaria para sobrevivir en entornos caracterizados por la fluctuación diferentes recursos alimentarios (Van Schaik, *et al.*, 1993).

Aquí en nuestro estudio encontramos que los cambios estacionales en términos de la proporción de alimentos, patrones dietéticos y abundancia relativa de taxones bacterianos se correlacionaron fuertemente con los cambios en la dieta de los primates, esto también se ha observado en estudios previos (Amato *et al.*, 2015; Barelli *et al.* 2015; Hicks *et al.*, 2018).

La mayor riqueza de familias bacterianas encontrada en la temporada de lluvia, seguida por la temporada de nortes, y una proporción menor en la estación seca podría estar relacionado con una mayor diversidad de recursos alimentarios disponibles en la temporada de lluvias.

Estos datos indican que los microbiomas de los monos aulladores están cambiando en respuesta a los cambios en la dieta, lo que sugiere un papel del microbioma en la plasticidad de los aulladores en las variaciones dietéticas acorde a las estaciones e independientemente de las condiciones del hábitat.

#### *D) Monos aulladores y ganado doméstico, una ¿sana convivencia?*

La expansión demográfica, la demanda de alimentos, el factor económico, son términos que podríamos usar para explicar (nunca para justificar), la invasión que el hombre ha hecho con el hábitat de muchas especies silvestres (PROFEPA, 2019). Los monos aulladores se han enfrentado a este problema y, a diferencia de otras especies menos afortunadas, de alguna forma se han adaptado a convivir con sus nuevos cohabitantes.

Muchos son los estudios que han demostrado que es posible una transmisión bacteriana interespecie (Giacometti *et al.* 2000; Daszak *et al.* 2000; Kagambega *et al.* 2013; Jarquín-Díaz *et al.* 2016). Sin embargo, también es cierto que esto no siempre significa que las bacterias sean capaces de implantarse y colonizar un nuevo organismo.

Nosotros planteamos la posibilidad de conocer mediante el estudio del microbioma, si es posible que la microbiota de los aulladores se modifique por la interacción con fauna ganadera, pero, como suele suceder en estudios pioneros, los resultados obtenidos nos dejan con más preguntas que respuestas.

Como se esperaba, las diferencias entre la composición microbiana de los monos silvestres y la fauna ganadera son notables, aunque existen algunas interrogantes como por ejemplo la presencia de *Prevotellaceae* UCG004, un grupo de bacterias reportadas en el ganado, pero no en otros estudios con monos aulladores (Amato *et al.*, 2013), aun así, no podemos determinar el origen de estas bacterias en el microbioma de los aulladores.

Aun así, debemos considerar que la convivencia entre fauna silvestre y ganadera debe tenerse en cuenta como un factor de riesgo para ambas especies pues hasta ahora no están claras las implicaciones que esto puede tener para la salud de los animales y del ecosistema en general.

El estudio de la microbiota intestinal puede ser una herramienta que nos ayude a comprender estos efectos porque está directamente relacionado estado se salud de los individuos.El cautiverio resulta un factor importante en el caso de los monos aulladores, pues es una especie que tiene hábitos alimenticios muy específicos y es sensible a los cambios en la dieta.

## **Conclusiones**

El estudio del metagenoma de los monos aulladores negros en la región de Balancán, tabasco, abre paso a un amplio campo de estudio, pues es tan diverso como las mismas especies bacterianas que habitan en el intestino de los monos.

Los resultados que presentamos en cada parte de este estudio permiten obtener una visión más amplia de los factores que afectan la conservación del mono aullador como especie. Al conocer qué OTUs bacterianos se encuentran en el intestino de los monos y cómo varían en diversidad y abundancia en cada uno de los escenarios estudiados, nos permite inferir la importancia de ciertos grupos de bacterias como las *bifidobacterias*, o familias completas como Ruminocacceae y Lachnospiraceae que destacan por su función fibrolítica para las dietas folívoras de los aulladores.

Asimismo, contemplamos la posibilidad de transmisión bacteriana entre fauna ganadera y monos silvestres que comparten hábitat, considerando que, aunque los monos aulladores son de hábitos arbóreos, las condiciones de fragmentación extrema los han llevado a moverse a ras de suelo para buscar fuentes de agua, recursos alimentarios o para moverse entre fragmentos, pero dejando claro que para que se dé una transmisión “efectiva” es necesaria una exposición constante así como otros factores que faciliten la colonización.

Finalmente, es necesario continuar con estudios tanto de metagenómica funcional para determinar los grupos de bacterias de mayor importancia con base en la función que desempeñan en el organismo y qué factores influyen en su establecimiento (incluyendo la transmisión bacteriana interespecie), así como estudios, bioquímicos y microbiológicos de las especies bacterianas de interés.

## Referencias

- Amato KR., Yeoman CJ., Kent A., Righini N., Carbonero F., Estrada A., Gaskins H., Stumpf RM., Yildirim S., Torralba M., Gillis M., Wilson BA., Nelson KE., White BA. and Leigh SR. (2013). Habitat degradation impacts black howler monkey (*Alouatta pigra*) gastrointestinal microbiomes. *The ISME Journal* 7, 1344–1353.
- Amato KR., Leigh SR., Kent A., Mackie RI., Yeoman CJ., Stumpf RM., Wilson BA., Nelson A., White BA. and Garber PA. (2015). The Gut Microbiota Appears to Compensate for Seasonal Diet Variation in the Wild Black Howler Monkey (*Alouatta pigra*). *Microb Ecol* 69:434–443. 19.
- Aristizabal JF. (2013). Estrategias de forrajeo y características nutricionales de la dieta del mono aullador negro (*Alouatta pigra*) en un ambiente fragmentado (Tesis de Maestría). México: Instituto de Ecología. A. C. p. 90 Disponible en: [http://primates.inecol.edu.mx//test/ver\\_tesis/82](http://primates.inecol.edu.mx//test/ver_tesis/82).
- Bottazzi V. (1983). Food and Feed Production with microorganisms. *Biotechnology* 3:5:315-63.
- Chapman CA. (1990). Ecological constraint opens a group size in three species of neotropical primates. *Folia Primatol* 55:1-9.
- Daszak P., Cunningham AA. and Hyatt AD. (2000). Emerging infectious diseases of wildlife - threats to biodiversity and human health. *Science* 287, 443-449.
- Escudero Álvarez, E., & González Sánchez, P. (2006). La fibra dietética. *Nutrición hospitalaria*, 21, 61-72.
- Giacometti M., Frey J. and Abidoetal M. (2000). Infectious keratoconjunctivitis. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 142, 235-240.
- Hong W. and Chen M. (2007). Rapid identification of bifidobacteria in dairy products by gene-targeted species-specific PCR technique and DGGE. *Asian-Aust J Anim Sci.*;20(12):1887.
- Jarquín-Díaz VH., Barbachano-Guerrero A., Maldonado-Rodríguez R., Vásquez-Aguilar AA. and Aguilar-Faisal L. (2016). First molecular evidence of *Hepatozoon canis* in

- domestic dogs and ticks in fragmented rainforest areas in Mexico. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vprsr.2016.11.001>
- Kagambèga A., Lienemann T., Aulu L., Traoré A., Barro N., Siitonen A. and Haukka K. (2013). Prevalence and characterization of *Salmonella enterica* from the feces of cattle, poultry, swine and hedgehogs in Burkina Faso and their comparison to human *Salmonella* isolates. *BMC Microbiology*, 13:253
- Matsuki T, Watanabe K, Tanaka R, Oyaizu H. (1998). Rapid identification of human intestinal bifidobacteria by 16S rRNA-targeted species- and group-specific primers. *FEMS Microbiol Lett.* 167(2):113-121.
- Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J. (2002). Development of 16S rRNA-gene- targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces. *Appl Environ Microbiol.* 68(11):5445-5451.
- Matsuki T, Watanabe K, Tanaka R. (2003). Genus- and species-specific PCR primers for the detection and identification of bifidobacterial. *Intest Microbiol.* 4:61-69.
- Milton K. (1980). *The Foraging Strategy of Howler Monkeys: A Study in Primate Economics*. New York: Columbia University Press.
- Nakamura N., Amato KR., Gerber P., Estrada A., Mackie RI. and Gaskins HR. (2011). Analysis of the hydrogenotrophic microbiota of wild and captive black howler monkeys (*Alouatta pigra*) in Palenque National Park, México. *Am. J. of Prim.* Vol. 73 (9). 909-919.
- Park MS, Kwon B, Ku S, Ji GE. (2017). The efficacy of *Bifidobacterium longum* BORI and *Lactobacillus acidophilus* AD031 probiotic treatment in infants with rotavirus infection. *Nutrients.*;9(8):887.
- Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (PROFEPA), Vida silvestre, Universo de atención, consultado en <https://www.gob.mx/profepa/acciones-y-programas/universo-de-atencion-en-materia-de-vida-silvestre>, 20-05-2020.

Pozo-Montuy G. and Serio-Silva JC. (2006). Comportamiento Alimentario de Monos Aulladores Negros (*Alouatta pigra lawrense cebidae*) en Hábitat Fragmentado en Balancán, Tabasco, México. *Acta Zoológica Mexicana* (n.s.) 22 (3): 53-66.

Vieira AT., Rocha, VM., Tavares, L., Garcia, CC., Teixeira, MM., Oliveira, SC., and Nicoli, JR. (2016). Control of *Klebsiella pneumoniae* pulmonary infection and immunomodulation by oral treatment with the commensal probiotic *Bifidobacterium longum* 51A. *Microbes and infection*, 18(3), 180-189.

Yun B, Song M, Park DJ, Oh S. (2017). Beneficial effect of *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 on survival rate of *Clostridium difficile* infection in mice. *Korean J Food Sci Anim Resour.*37(3):368.

# ANEXO

Antonio Acini Vásquez-Aguilar,<sup>1</sup> Fernanda Odett Toledo-Manuel<sup>2</sup>  
Arturo Barbachano-Guerrero,<sup>3</sup> and Dolores Hernández-Rodríguez<sup>4,5</sup>

Detection of Antimicrobial Resistance Genes in *Escherichia coli*  
Isolated from Black Howler Monkeys (*Alouatta pigra*) and Domestic  
Animals in Fragmented Rain-Forest Areas in Tabasco, Mexico.

SHORT COMMUNICATIONS *Journal of Wildlife Diseases*, 56(4),

pp. 000–000 DOI: 10.7589/2019-10-243

# SHORT COMMUNICATIONS

DOI: 10.7589/2019-10-243

Journal of Wildlife Diseases, 56(4), 2020, pp. 000–000  
© Wildlife Disease Association 2020

## Detection of Antimicrobial Resistance Genes in *Escherichia coli* Isolated from Black Howler Monkeys (*Alouatta pigra*) and Domestic Animals in Fragmented Rain-Forest Areas in Tabasco, Mexico

Antonio Acini Vásquez-Aguilar,<sup>1</sup> Fernanda Odett Toledo-Manuel,<sup>2</sup> Arturo Barbachano-Guerrero,<sup>3</sup> and Dolores Hernández-Rodríguez<sup>4,5</sup> <sup>1</sup>Instituto de Ecología, A.C. Red de Biología Evolutiva. Xalapa, Veracruz 91070, Mexico; <sup>2</sup>Universidad Veracruzana. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Peñuela, Córdoba, Veracruz 94500, México; <sup>3</sup>State University of New York, Upstate Medical University, Department of Microbiology and Immunology, Syracuse, New York 13210, USA; <sup>4</sup>Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Sistemas Biológicos, Laboratorio de Biotecnología. CDMX, 04960, México; <sup>5</sup>Corresponding author (email: mvzloreshr@gmail.com)

**ABSTRACT:** The appearance and spread of antimicrobial resistance (AMR) in bacteria in natural environments and wildlife are related to agricultural and livestock activities and are a global health and conservation problem. We assessed the presence of AMR genes in *Escherichia coli* isolated from black howler monkeys (*Alouatta pigra*), sheep (*Ovis aries*), cattle (*Bos taurus*), and horses (*Equus caballus*) from a highly fragmented forest in southern Mexico. Fresh fecal samples were collected using swabs, seeded on eosin-methylene blue agar, and *E. coli* colonies identified by PCR; multiplex-PCR was performed on *E. coli* DNA for the detection of 10 AMR genes from four families (sulfonamides, tetracycline,  $\beta$ -lactamase, and chloramphenicol). We detected *E. coli* in 94% (48/51) of fecal samples, of which 33% (16/48) tested positive for at least one AMR gene. We detected AMR genes in at least one individual from each sampled animal species, with the most prevalent genes being *tet(B)* 18% (9/48), *sul2* 14% (7/48), *sul1*, and *bla*TEM 12% (6/48). Sheep samples contained AMR genes from the four families of antibiotics detected in this study and 50% (5/10) tested positive for the presence of at least one gene. A total of 12% (2/16) of fecal samples from black howler monkeys tested positive for AMR genes. The presence of AMR genes in *A. pigra* and domestic animals has not been reported in the Balancán area of Tabasco, Mexico. Transmission of AMR bacteria from domestic animals to monkeys is rare; however, this is a potential health risk for wildlife and species conservation.

**Key words:** Antibiotics, beta-lactams, cattle, conservation medicine, Mexico, nonhuman primates, PCR-multiplex.

Antimicrobial resistance (AMR) is a major global health challenge and is an important topic at the interface of human, animal, and ecosystem health (Butaye et al. 2014). The occurrence of AMR in bacteria in wild

animals has been increasingly reported in many species (Ramey and Ahlstrom 2020), but its prevalence may be underestimated. Anthropogenic factors such as habitat overlap can increase the risk of transmission of bacteria carrying AMR genes among humans, livestock, and wild animals, creating new host reservoirs (Rwego et al. 2008). Prevalence of AMR bacteria among wildlife appears to be multifactorial, depending on habitat use and foraging strategy of the species, particularly as they relate to anthropogenic inputs into the environment (Ramey and Ahlstrom 2020).

The black howler monkey (*Alouatta pigra*) is a neotropical primate inhabiting tropical rain-forest areas from southern Mexico and is considered a critically endangered species on the Red List (International Union for Conservation of Nature 2019). Being arboreal, these primates are not expected to directly interact often with either humans or domestic animals (Ramey and Ahlstrom, 2020). However, in Balancán, Tabasco, Mexico, the high degree of habitat fragmentation has led the monkeys to live in small forest patches that they share with domestic fauna and humans, often descending from the trees to move between forest patches through livestock roaming areas (Supplementary Material [video]; Estrada and Coates-Estrada 1996; Pozo-Montuy and Serio-Silva 2007). We believe that these behaviors expose howler monkeys to the transmission of microbes from livestock as reported in several studies conducted with other primate species (Rolland et al. 1985; Rwego et al. 2008; Tegner et al. 2019).

*Escherichia coli* is a common gastrointestinal bacterium that has been used as a model



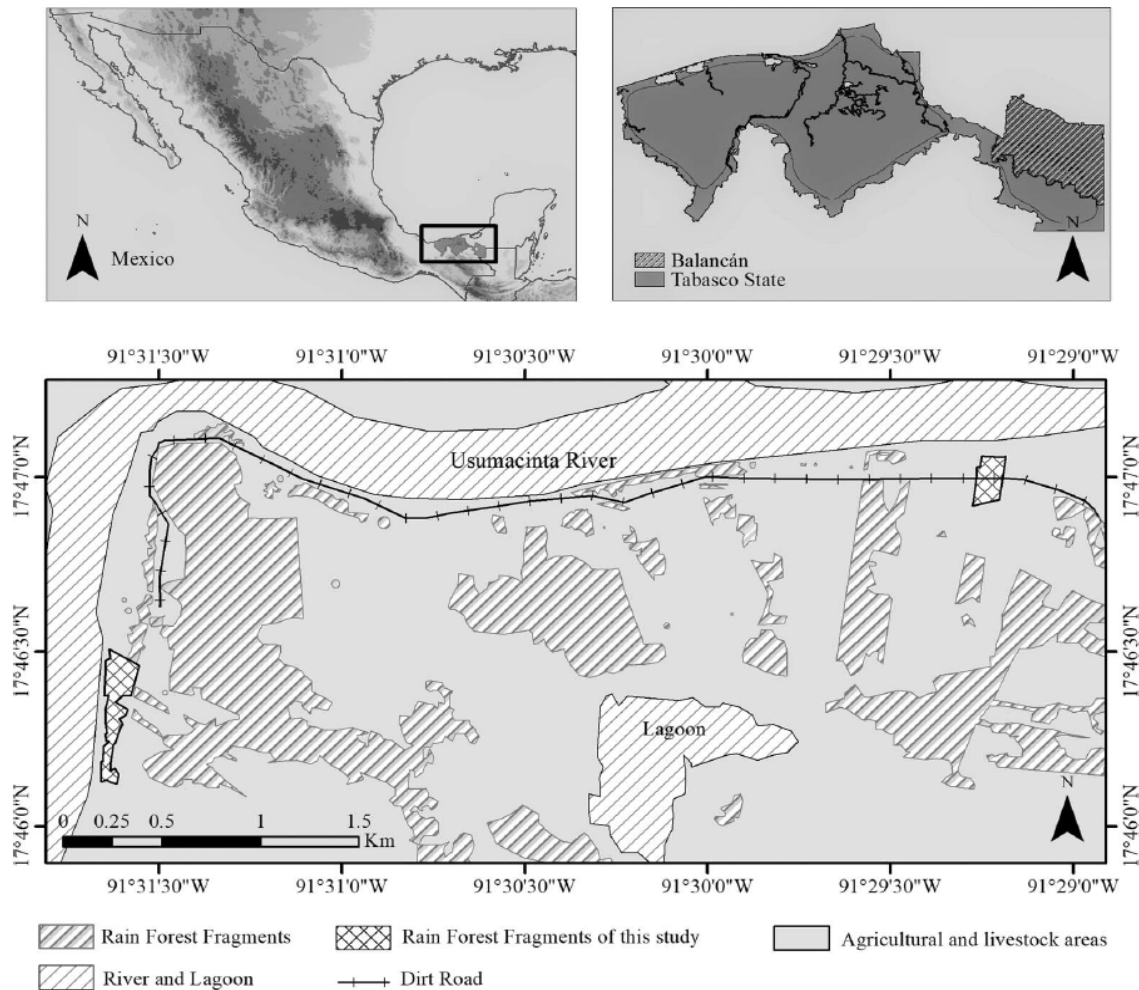


FIGURE 1. Study area. Map showing the location of the two forest fragments studied and the agricultural and livestock area where fecal samples were collected from black howler monkeys (*Alouatta pigra*), cattle (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*), and horses (*Equus caballus*) in Balacan, Tabasco, Mexico.

for microbial transmission among wildlife, domestic animals, and humans; moreover, these studies have provided valuable information in formulating conservation recommendations to reduce pathogen transmission (Rwego et al. 2008; Allen et al. 2011). The objective of this study was to detect AMR genes in *E. coli* isolates from black howler monkeys and domestic animals in rain-forest fragments with areas of agricultural and livestock activities.

The study was performed in the region of the Usumacinta River basin in Balacan, Tabasco, Mexico (17°46'48"N, 91°30'22"W; Fig. 1). This area is part of a highly fragmented landscape

where original forests have lost around 80% of their original cover (Pozo-Montuy and Serio-Silva 2007; Hernández-Rodríguez et al. 2019). During January 2016, samples were collected from two troops of black howler monkeys inhabiting two forest fragments and from domestic animals such as cattle (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*), and horses (*Equus caballus*) from the surrounding open grazing areas. Recently excreted fecal samples were collected using fecal swab™ (Copan Diagnostics Inc., Murrieta, California, USA), avoiding soil contamination, placed in phosphate-buffered saline (pH 7.4; Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA; Cristóbal-Azkarate et al. 2014), and

stored in a cooler box with ice packs ( $5\pm 3$  C) followed by electrical refrigeration once available (Tegner et al. 2019). Only one sample per individual was collected. Fecal swabs were cultured for *E. coli* on eosin–methylene blue agar overnight at 37 C using standard protocols (Renoux and Terdjman 1951). From each animal, a pool of three representative colonies compatible with *E. coli* morphologic characteristics was selected for molecular identification. We extracted DNA from bacteria using the DNeasy blood and tissue kit (Qiagen, Hercules, California, USA). Molecular identification of *E. coli* by PCR was performed using a previously published protocol (Chen and Griffiths 1998). If the pool of *E. coli* from a sample was confirmed as positive, the animal was considered a carrier of *E. coli*. For the detection of AMR genes in *E. coli* DNA, we performed four different multiplex PCRs using the multiplex PCR kit (Qiagen) and 10 previously published pairs of specific primers for AMR genes (Table 1): sulfonamides (*sul1*, *sul2*, and *sul3*), tetracycline (*tet[A]*, *tet[B]*, and *tet[C]*),  $\beta$ -lactamase (*blaTEM*, *blaSHV*, and *blaCMY-2*), and chloramphenicol (*cmlA*).

We collected 51 fecal samples, one per individual: 16 from howler monkeys, 20 from cattle, 10 from sheep, and five from horses. We detected *E. coli* in 94% (48/51) of fecal samples, which were further analyzed for AMR genes; *E. coli* was not detected in three samples from cattle. Table 2 summarizes the number of samples analyzed per animal species and the prevalence of AMR genes.

Each AMR gene tested was detected in at least one sample. Resistance genes were detected in 33% (16/48) of samples carrying *E. coli*. The most prevalent resistance gene was *tet(B)* at 18% (9/48) and was the only gene detected in at least one sample from each animal species. The less prevalent resistance gene was *tet(C)* at 4% (2/48). We detected all AMR genes in samples from domestic animals, with sheep carrying all of those except for *blaSHV*. Horses and sheep showed high prevalence of AMR genes, with 60% (3/5) and 50% (5/10) respectively, whereas black howler monkeys showed the lowest prevalence, at 12% (2/16) with *sul1* and *tet(B)* detected in one independent sample each. Most of the

analyzed genes were detected in more than one animal species except for *cmlA*, which was found only in sheep.

Antimicrobial agents are indispensable for the control of bacterial infections; however, their indiscriminate use and management favor the selection of AMR bacteria (Butaye et al. 2014). Previous studies have detected AMR genes in bacteria from many wildlife species (Allen et al. 2011; Chen et al. 2018; Ramey and Ahlstrom 2020), including nonhuman primates (Rolland et al. 1985; Rwegu et al. 2008; Tegner et al. 2019). However, few studies address this issue in endangered New World primates (Cristóbal-Azkarate et al. 2014).

Nonhuman primates can be asymptomatic carriers of AMR bacteria such as *E. coli*, *Campylobacter* spp., or *Salmonella* spp.; however, these bacteria can cause fatal diseases and are a concern regarding the conservation of free-ranging primate populations (Tegner et al. 2019). Results from this study showed a total AMR gene prevalence of 12% (2/16) for samples from black howler monkeys, lower compared with the domestic animals analyzed. The prevalence reported here for howler monkeys is also lower compared with a previous report for a Mexican primate species (*Alouatta palliata*) that had a prevalence of 43–47% for tetracycline and 12–19% for sulfonamide (Cristóbal-Azkarate et al. 2014).

The acquisition of bacteria in wild primates can occur through contact with human food waste, contact with other species, soil, feces, or contaminated water (Tegner et al. 2019). The arboreal habits of black howler monkeys reduce the contact with bacteria that may carry AMR genes (Estrada and Coates-Estrada 1996), unlike domestic animals that, in addition to receiving prophylactic treatments, are exposed to waste from other animals and humans (Allen et al. 2011; Ramey and Ahlstrom 2020). Howler monkeys from our study area have been reported to descend from the trees to move through livestock areas between forest fragments, and for direct water intake from tree holes and from a lagoon near the study site (Pozo-Montuy and Serio-Silva

TABLE 1. Primer sequences and multiplex PCR conditions used for the detection of antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli* DNA from the analyzed fecal samples collected from black howler monkeys (*Alouatta pigra*), cattle (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*), and horses (*Equus caballus*) in Balancán, Tabasco, Mexico.

PCR <sup>a</sup>	Target gene	Primer	Sequence	Concentration (μM)	Size (bp) <sup>b</sup>	Annealing temperature (C)	Reference
1	<i>su1</i>	sul1-F	5'-CGGCGTGGGCTACCTGAACG-3'	0.2	433	66	Kerm et al. 2002
		sul1-B	5'-GCCCATCGCGTGAAGTTCCG-3'	0.2			
1	<i>su2</i>	sul1-L	5'-CGGCATCGTCAACATAACCT-3'	0.3	721	66	Lanz et al. 2003
		sul1-R	5'-TGTGGGATGAAGTCAGCTC-3'	0.3			
1	<i>su3</i>	sul3-GKa-F	5'-CAACGGAAATGGGGTTGTGGA-3'	0.2	244	66	Kozac et al. 2009
		sul3-GKa-R	5'-GCTGCCACCAATTCGCTGAACG-3'	0.2			
2	<i>tet(A)</i>	tetA-L	5'-GGCGTCTTTCATCATGC-3'	0.1	502	63	Lanz et al. 2003
		tetA-R	5'-CGGCAGCCAGAGCAAGTAGA-3'	0.1			
2	<i>tet(B)</i>	tetBCK-F	5'-CGCCAGTCTGTTGTTCTC-3'	0.2	173	63	Goswami et al. 2008
		tetBCK-R	5'-CGCGTTGAGAAAGCTGAGGTG-3'	0.2			
2	<i>tet(C)</i>	tetC-L	5'-GCTGTAGCCATAGCCTTGGT-3'	0.5	888	63	Lanz et al. 2003
		tetC-R	5'-GCGGGAAGCGAGAAATCA-3'	0.5			
3	<i>blaTEM</i>	GKTEMF	5'-TTAACTGGCCAACTACTTAC-3'	0.2	247	55	Kozac et al. 2009
		GKTEMR	5'-GTCTATTTCGTTATCCATA-3'	0.2			
3	<i>blaSHV</i>	SHV-F	5'-AGGATTGACTGCCTTTTTCG-3'	0.4	393	55	Colom et al. 2003
		SHV-R	5'-ATTGCTGATTCGCTCG-3'	0.4			
3	<i>blaCMY-2</i>	CMYF	5'-GACAGCCCTTTTCTCCACA-3'	0.2	1000	55	Kozac et al. 2009
		CMYR	5'-TGGACACGAAAGCCTACGTA-3'	0.2			
4	<i>cmlA</i>	cmlA-L	5'-TTGCAACAGTACGTGACAT-3'	0.35	293	55	Travis et al. 2006
		cmlA-R	5'-ACACAAACGTGTACAACCAG-3'	0.35			

<sup>a</sup> Multiplex PCR thermal cycling conditions: one cycle of 15 min at 95°C; 30 cycles of 1 min at 95°C, 1 min at the specific alignment temperature (from table), and 1 min at 72°C; and one cycle of 10 min at 72°C.

<sup>b</sup> bp = base pair.

TABLE 2. Prevalence of antimicrobial resistance (AMR) genes in *Escherichia coli* DNA from black howler monkey (*Alouatta pigra*), cattle (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*), and horses (*Equus caballus*) detected by PCR in Balancán, Tabasco, Mexico.

Antimicrobial family	AMR gene	% Positive samples (n)				
		Howler monkey (16)	Cattle (17)	Sheep (10)	Horse (5)	All species (48 <sup>b</sup> )
Sulfonamides	<i>sul1</i>	ND <sup>a</sup>	1 (5.8)	5 (50)	ND	6 (12.5)
	<i>sul2</i>	1 (6.25)	2 (11.7)	4 (40)	ND	7 (14.5)
	<i>sul3</i>	ND	ND	2 (20)	1 (20)	3 (6.25)
Tetracycline	<i>tet(A)</i>	ND	1 (5.8)	4 (40)	ND	5 (10.4)
	<i>tet(B)</i>	1 (6.25)	2 (11.7)	4 (40)	2 (40)	9 (18.7)
	<i>tet(C)</i>	ND	1 (5.8)	1 (10)	ND	2 (4.16)
β-lactamase	<i>blaTEM</i>	ND	2 (11.7)	4 (40)	ND	6 (12.5)
	<i>blaSH</i>	ND	2 (11.7)	ND	1 (20)	3 (6.25)
	<i>blaCMY-Z</i>	ND	2 (11.7)	2 (20)	ND	4 (8.33)
Chloramphenicol	<i>cmlA</i>	ND	ND	3 (30)	ND	3 (6.25)
	Any gene	2 (12.5)	6 (35.2)	5 (50)	3 (60)	16 (33.3)

<sup>a</sup> AMR = ND, gene not detected in the isolate.

<sup>b</sup> Only 48 of 51 animal samples carried *Escherichia coli* DNA.

2007; Supplementary Material [video]). This behavior in howler monkeys may increase their exposure to bacteria from other animals, also increasing the risk of acquisition of AMR bacteria as they are prevalent among the domestic animals that roam the area.

Our results showed a high prevalence of AMR genes in domestic animals compared with other studies. Rwego et al. (2008) reported a prevalence of 27% and Butaye et al. (2014) a range of 3.9% to 43%, whereas in our study the prevalence ranged between 35% and 60%. Increased AMR in domestic animals is associated with the use of antimicrobial agents and with direct exposure to bacteria carrying these genes (Allen et al. 2011). In Mexico, veterinary antibiotics are easily obtained without a prescription and can be used indiscriminately. In the Balancán area, antibiotics are commonly used for domestic animals and these practices could be the cause of the high prevalence of AMR genes in our study sample.

In conclusion, we report AMR genes in samples from black howler monkeys in Mexico and in domestic animals in Balancán. On the basis of our data and given the local habitat fragmentation, we infer that the transmission of ARM genes between domestic

animal species and black howler monkeys is possible, but rare in the studied location. This study helps to emphasize the importance of the proper use of antimicrobials from the perspective of conservation medicine.

We thank the Estación de Investigación Primatológica y Vida Silvestre established in Balancán, Tabasco, Mexico by Instituto de Ecología A.C. for their support; Juan Carlos Serio Siva and Francisca Vidal for support with sample collection, and Dolores Tejero Geronimo for help in the field. We also thank Alejandro Azaola Espinosa and the Laboratorio de Biotecnología at the Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco for their support in bacterial isolation and Hilda Montero Ladrón de Guevara from the Instituto de Salud Pública de la Universidad Veracruzana for support in the molecular biology laboratory.

#### SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material for this article is online at <http://dx.doi.org/10.7589/2020-10-243>.

#### LITERATURE CITED

Allen SE, Boerlin P, Janecko N, Lumsden JS, Barker IK, Pearl DL, Reid-Smith RJ, Jardine C. 2011. Antimi-

- icrobial resistance in generic *Escherichia coli* isolates from wild small mammals living in swine farm, residential, landfill and natural environment in Southern Ontario, Canada. *Appl Environ Microbiol* 77:882–888.
- Butaye P, van Duijkeren E, Prescott JF, Schwarz S. 2014. Antimicrobial resistance in bacteria from animals and the environment. *Vet Microbiol* 171:269–272.
- Chen D, Zou W, Xie S, Kong L, Chen Y, Zhang X, Li J, Wang H, Cheng G, Qin Y, et al. 2018. Serotype and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from feces of wild giant pandas (*Ailuropoda melanoleuca*) in Sichuan Province, China. *J Wildl Dis* 54: 691–699.
- Chen J, Griffiths MW. 1998. PCR differentiation of *Escherichia coli* from other Gram-negative bacteria using primers derived from the nucleotide sequences flanking the gene encoding the universal stress protein. *Lett Appl Microbiol* 27:369–371.
- Colom K, Perez J, Alonso R, Fernandez-Aranguiz A, Larino E, Cisterna R. 2003. Simple and reliable multiplex PCR assay for detection of *bla*TEM, *bla*SHV and *bla*OXA-1 genes in *Enterobacteriaceae*. *FEMS Microbiol Lett* 223:147–151.
- Cristóbal-Azkarate J, Dunn JC, Day JMW, Amáñile-Cuevas CF. 2014. Resistance to antibiotics of clinical relevance in the fecal microbiota of Mexican wildlife. *PLoS One* 9:e107719.
- Estrada A, Coates-Estrada R. 1996. Tropical rain forest fragmentation and wild populations of primates at Los Tuxtlas, Mexico. *Int J Primatol* 17:759–783.
- Goldberg TL, Gillespie TR, Rwego IB, Estoff EL, Chapman CA. 2008. Forest fragmentation as cause of bacterial transmission among nonhuman primates, humans, and livestock, Uganda. *Emerg Infect Dis* 14: 1375.
- Goswami PS, Gyles CL, Friendship RM, Poppe C, Kozak GK, Boerlin P. 2008. Effect of plasmid pTENT2 on severity of porcine postweaning diarrhoea induced by an O149 enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Vet Microbiol* 131:400–405.
- Hernández-Rodríguez D, Vásquez-Aguilar AA, Serio-Silva JC, Rebollar EA, Azaola-Espinosa A. 2019. Molecular detection of *Bifidobacterium* spp. in faeces of black howler monkeys (*Alouatta pigra*). *J Med Primatol* 48: 99–105.
- International Union for Conservation of Nature. 2019. IUCN Red List categories. IUCN. Version 2017-3. www.iucnredlist.org. Accessed March 2019.
- Kern MB, Klemmensen T, Frimodt-Møller N, Espersen F. 2002. Susceptibility of Danish *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections and bacteraemia, and distribution of *sul* genes conferring sulphonamide resistance. *J Antimicrob Chemother* 50:513–516.
- Kozak GK, Boerlin P, Janecko N, Reid-Smith RJ, Jardine C. 2009. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from swine and wild mammals in the proximity of swine farms and in natural environments in Ontario, Canada. *Appl Environ Microbiol* 75:559–566.
- Lanz R, Kuhnert P, Boerlin P. 2003. Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* from different animal species in Switzerland. *Vet Microbiol* 91:73–84.
- Pozo-Montuy G, Serio-Silva JC. 2007. Movement and resource use by a group of *Alouatta pigra* in a forest fragment in Balancán, México. *Primates* 48:102–107.
- Ramey AM, Ahlstrom CA. 2020. Antibiotic resistant bacteria in wildlife: Perspectives on trends, acquisition and dissemination, data gaps, and future directions. *J Wildl Dis* 56:1–15.
- Renoux G, Terdjman A. 1951. Clinical value of the precise identification of gram-negative urinary bacilli; practical value of the medium eosine–methylene blue (EMB). *Presse Méd* 59:203–206.
- Rolland RM, Hausfater G, Marshall B, Levy SB. 1985. Antibiotic-resistant bacteria in wild primates: Increased prevalence in baboons feeding on human refuse. *Appl Environ Microbiol* 49:791–794.
- Rwego IB, Isabirye-Basuta G, Gillespie TR, Goldberg TL. 2008. Gastrointestinal bacterial transmission among humans, mountain gorillas, and livestock in Bwindi Impenetrable National Park, Uganda. *Conserv Biol* 22:1600–1607.
- Tegner C, Sunil-Chandra NP, Wijesooriya WRPLI, Perera BV, Hansson I, Fahlman A. 2019. Detection, identification, and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* spp. and *Salmonella* spp. from free-ranging nonhuman primates in Sri Lanka. *J Wildl Dis* 55:879–884.
- Travis RM, Gyles CL, Reid-Smith R, Poppe C, McEwen SA, Friendship R, Janecko N, Boerlin P. 2006. Chloramphenicol and kanamycin resistance among porcine *Escherichia coli* in Ontario. *J Antimicrob Chemother* 58:173–177.

Submitted for publication 3 October 2019.

Accepted 4 March 2020.