

남극 로스해 지역의 아델리펭귄과 황제펭귄 분변 유전자를 활용한 남극 펭귄 장내 미생물의 메타지놈 분석

최소윤¹ · 이승재¹ · 조민주¹ · 최은경¹ · 김진무¹ · 김정훈² · 김현우³ · 박현^{1*}

¹고려대학교 생명공학과

²한국해양과학기술원 부설 극지연구소

³부경대학교 자원생물학과

Metagenomic Analysis of Antarctic Penguins Gut Microbial Dynamics by using Fecal DNA of Adélie (*Pygoscelis adeliae*) and Emperor (*Aptenodytes forsteri*) Penguins in Ross Sea, Antarctica

Soyun Choi¹, Seung Jae Lee¹, Minjoo Cho¹, Eunkyoung Choi¹, Jinmu Kim¹, Jeong-Hoon Kim², Hyun-Woo Kim³, Hyun Park^{1*}

¹Division of Biotechnology, College of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Seoul 02841, Korea

²Division of Life Sciences, Korea Polar Research Institute (KOPRI), Incheon 21990, Korea

³Department of Marine Biology, Pukyong National University, Busan 48513, Korea

Corresponding Author

Hyun Park

Division of Biotechnology, College of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Seoul 02841, Korea

E-mail : hpark@korea.ac.kr

Received : January 30, 2023

Revised : January 31, 2023

Accepted : March 06, 2023

본 연구에서는 남극 로스해 연안에 서식하는 아델리펭귄(*Pygoscelis adeliae*)과 황제펭귄(*Aptenodytes forsteri*)의 분변 시료를 기반으로 펭귄 장내 미생물 메타지놈 연구를 수행하였다. Taxonomy 분석 결과, 아델리펭귄과 황제펭귄의 장내 미생물에는 주로 7개의 문(phylum), 18개의 과(family)가 존재하는 것으로 나타났다. 또한 미생물 다양성을 평가하기 위해 Alpha diversity 및 OTU abundance 분석을 수행한 결과, 전반적으로 아델리펭귄의 장내 미생물 다양성이 황제펭귄보다 높은 것을 확인하였고, PCoA를 기반으로 한 Beta diversity 분석을 통해 두 개체군 간 장내 미생물 군집에 차이가 존재함을 확인하였다. PICRUSt를 활용한 기능적인 차원의 KEGG pathway 분석을 통해서 아델리펭귄과 황제펭귄 시료에서 nucleoside and nucleotide biosynthesis pathway가 가장 많이 존재하는 것을 확인하였다. 본 연구를 통해 남극 아델리펭귄과 황제펭귄의 장내미생물 구성과 다양성을 비교분석 할 수 있었다. 본 연구 결과는 향후 펭귄의 먹이 섭식 관련 연구에 활용될 수 있으며, 더 나아가 다양한 남극 생물의 장내 미생물 메타지놈 분석에 대한 기초가 될 수 있을 것이다.

This study applied a metagenomic analysis of the penguins' gut microbiome from fecal samples of Adélie Penguin (*Pygoscelis adeliae*) and Emperor Penguin (*Aptenodytes forsteri*) living along the Ross Sea, Antarctica. As a result of taxonomic analysis, 7 phyla and 18 families were mainly present in the gut microbiome of Adélie and Emperor penguins. To assess microbial diversity, we performed alpha diversity and OTU abundance analyses. It was confirmed that the Adélie Penguin's gut microbial species had a higher diversity than Emperor Penguin's. Based on the Beta diversity analysis using PCoA, differences were observed in the clustering between Adélie and Emperor penguins, respectively. Through the KEGG pathway analysis using PICRUSt, the nucleoside and nucleotide biosynthesis pathway was the most prevalent in Adélie and Emperor penguins. This study enabled a comparison and analysis of the composition and diversity of the gut microbiome in Adélie and Emperor Penguins. It could be utilized for future research related to penguin feeding habits and could serve as a foundation for analyzing the gut microbiomes of various other Antarctic organisms.

Keywords: *Pygoscelis adeliae*(아델리펭귄), *Aptenodytes forsteri*(황제펭귄), Ross sea(로스해), Metagenome(균유전체학), Gut microbiome analysis(장내미생물 분석)

서론

최근 심각한 기후 변화와 조업 활동의 증가로 인해 많은 해양 지역들이 위협을 받고 있으며, 남극의 로스해 지역도 예외가 아니다(Doney et al., 2012; Michel et al., 2019). 로스해 연안은 해양 환경에서부터 플랑크톤, 크릴 및 어류를 거쳐 상위 포식자 펭귄까지 이어지는 생태계의 구조 및 기능을 연구하는데 최적화된 지역으로, 남극 로스해에 일어나는 환경 변화는 곧 해당 지역에 서식하고 있는 다양한 생물들에게도 영향을 미친다(Hopkins, 1987; Smith et al., 2014). 아델리펭귄(Adélie Penguin, *Pygoscelis adeliae*)과 황제펭귄(Emperor Penguin, *Aptenodytes forsteri*)은 로스해 연안 지역에 주로 서식하는 상위 포식자이므로, 이들을 통해 로스해의 해양생물자원 및 해양생태계의 기능 분석을 위한 생태 연구를 수행할 수 있다(Burns and Kooyman, 2001; Ainley et al., 2010; Fretwell et al., 2012). 특정 지역의 먹이그물 구조 파악을 통한 생태계 구성원 분석과 종 다양성 평가를 위해서는 다양한 연구 방법들이 적용될 수 있는데, 대표적으로 생물의 분변 시료를 활용한 먹이분석법이나 장내 미생물 분석법 등이 있다(Vallet et al., 2011; Lee et al., 2019; Quan et al., 2019). 지난 연구에서는 로스해 연안의 7개 서식지를 기반으로 아델리펭귄의 분변 시료를 활용하여 메타바코딩 및 정량 분석하였고, 이를 통해 펭귄들의 주 먹이원에 대한 연구를 진행한 바가 있다(Tabassum et al., 2022). 본 연구에서는 로스해 연안에 서식하는 아델리펭귄과 황제펭귄의 분변 시료를 활용하여 메타지놈 분석을 수행하고, 이를 통해 펭귄 장내 미생물의 구성과 함께 그 다양성 및 유전적 기능을 비교 분석하고자 한다.

재료 및 방법

1. 아델리펭귄과 황제펭귄의 분변 시료 채집

펭귄의 분변 시료는 2017년도부터 2019년도까지 11월부터 2월 사이에 남극 빅토리아 랜드의 로스해 연안에서 채집하였다. 아델리펭귄 번식지인 Cape Adare (CA), Cape Hallett (CH), Inexpressible Island (II), Edmonson Point (EP), Mandible Cirque (MC), Adeli Cove (AC)를 포함한 총 6곳에서 9개의 분변 시료를 채집하였고, 황제펭귄 번식지인 Cape Washington (CW)과 Coulman Island (CI)가 포함된 2곳에서는 3개의 분변 시료를 채집하였다(Fig. 1, Table 1). 채집된 시료는 total genomic DNA 추출을 위해 tissue lysis buffer를 추가한 뒤 -20°C에 보관하여 실험실로 운송하였다.

2. DNA 추출과 NGS를 이용한 염기서열 분석

채집된 펭귄 분변 시료로부터 DNA를 추출하기 위해 QIAGEN사의 DNeasy® PowerSoil® Kit를 사용하였다. 추출한 DNA는 Nano-

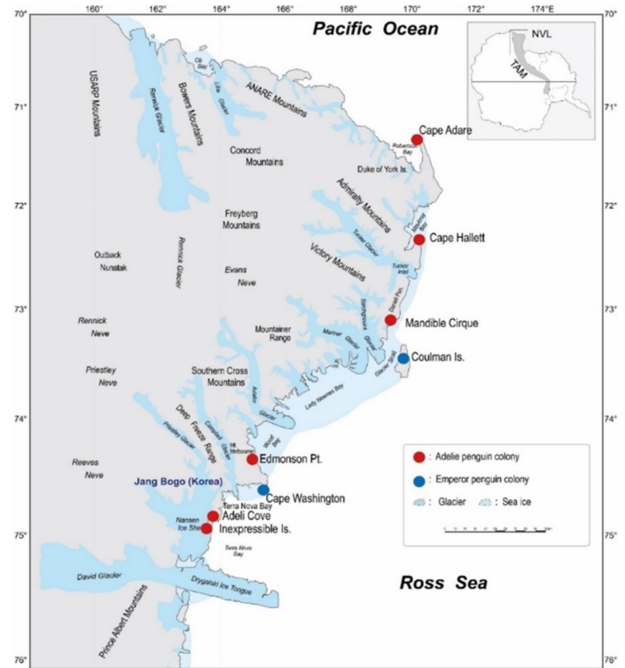


Fig. 1. Sampling locations on Ross Sea region, Antarctica. Red circle means colony of Adélie Penguin. Blue circle means colony of Emperor Penguin.

Drop을 이용하여 정량 분석을 수행하였다. 이후 차세대 염기서열 분석(NGS, Next Generation Sequence)을 위해 16S rRNA 유전자 의 V3, V4 영역을 타겟하는 프라이머인 341F, 785R를 사용하여 library를 제작하였다(Fadeev et al., 2021). DNA의 염기서열 분석은 Illumina사의 MiSeq (San Diego, CA, USA)을 이용하여 paired end 방법으로 각각 300 bp 길이의 서열 분석을 수행하였다.

3. Metagenome 분석을 통한 미생물 군집의 다양성 및 기능적 분석

16S rRNA sequencing 결과는 메타지놈 분석을 위하여 Qiime2 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology 2) (Bolyen et al., 2019)를 사용하여 진행하였다. 염기서열 내 chimera와 mitochondria 및 chloroplast 서열을 제거하는 quality control 과정은 Qiime2에서 처리되었다. 메타지놈 분석을 통해 97% 이상의 유사성을 갖는 염기서열끼리 클러스터화하여 분류 조작 단위인 OTU (Operational Taxonomic Unit)를 산출하였다. 이후 SILVA 데이터베이스를 기반으로 alignment 하여 각 OTU를 구분하였으며, 각 OTU 별 abundance를 기반으로 미생물 군집에 대한 분석을 수행하였다. 각 시료 내 미생물 군집 다양성을 확인하기 위해 alpha diversity 분석을 수행하였고, 그 과정에서 Shannon (Shannon diversity index), Chao1, Simpson (Simpson's diversity index), faith_pd (Faith's phylo-

Table 1. Information of penguin's fecal samples and summary of metagenomic analysis results of each fecal sample. '#' means 'Number'

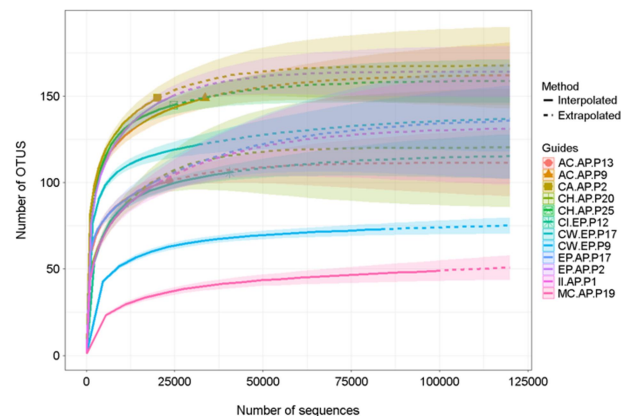
Species	Sampling site	Sample ID	# of OTUs	# of Singletons	# of Doubletons	# of Reads
Adélie Penguin	Cape Adare	CA.APP20	157	88	15	11,850
		CA.APP25	343	176	27	25,012
	Cape Hallet	CH.APP2	320	172	25	20,399
	Inexpressible Island	II.APP1	230	148	13	20,730
	Edmonson Point	EP.APP17	210	123	9	19,939
		EP.APP2	367	215	31	24,526
	Mandible Cirque	MC.APP19	249	193	10	99,447
	Adelie Cove	AC.APP13	241	141	13	23,595
		AC.APP9	381	219	31	33,838
Emperor Penguin	Cape Washington	CW.EPP9	301	206	16	83,764
		CW.EPP17	322	191	20	32,158
	Coulman Island	CI.EPP12	296	182	17	40,838

genetic diversity), observed_otus (number of distinct OTUs)와 같은 alpha diversity 지수를 활용하였다. 또한 시료 간의 미생물 군집 다양성을 분석하기 위해 PCoA (Principal Coordinate Analysis)를 활용하여 beta diversity 분석을 수행하였고(Huson and Weber, 2013; Lee et al., 2015), 각 개체군 및 시료 별 OTU abundance를 기반으로 특이적이거나 공통적인 OTU 개수를 비교 분석하였다. 마지막으로 PICRUSt (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States)를 활용한 KEGG pathway 분석을 통해 장내 미생물 내 유전자 산물의 대사 활동 경로를 분석하고, 잠재적인 대사 기능에 대한 상호작용을 예측하였다(Millares et al., 2015; Mohd Shaufi et al., 2015). 메타지놈 분석 결과는 R 프로그래밍(R 4.1.3, RStudio 2022.02.1+461)을 활용하여 plot으로 나타내었다.

결 과

1. DNA 추출 및 시퀀싱 결과

펭귄 분변 시료로부터 추출한 DNA는 QC 과정을 거친 뒤 Illumina Miseq를 활용하여 시퀀싱을 진행하였고, 그 결과로 OTU, Singleton, Doubleton, 그리고 Read 수를 확인하였다(Table 1). Rarefaction curve (Moon et al., 2013) 분석 결과, 그래프가 어느 한계점 이상에서는 완만 곡선을 그리는 것이 관찰되었기 때문에 시퀀싱의 양은 충분히 미생물의 군집분포를 나타낼 수 있다는 분석 결과의 신뢰성을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 메타지놈 분석 결과로

**Fig. 2.** Sample size-based rarefaction and extrapolation curves.

확인된 시료 별 OTU 개수는 CAAPP20가 157개로 가장 적었으며, ACAPP9가 381개로 가장 많이 확인되었다.

2. Metagenome 분석 결과

2.1 Taxonomy 분석 결과

각 OTU 별로 확인된 종을 통해 taxonomy 분석을 수행하여 시료 별 구성 미생물 종의 분포를 확인하였다(Fig. 3). 아델리펭귄과 황제펭귄의 분변 시료에서 문(Phylum) 수준의 분석 결과 7개의

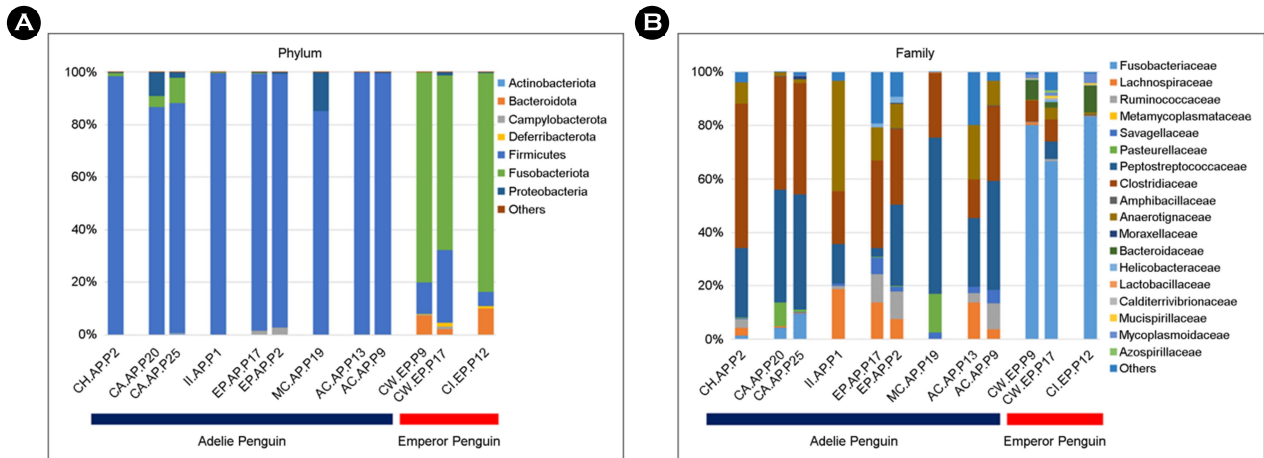


Fig. 3. Antarctic penguin's gut microbiota composition at the (A) phylum and (B) family levels.

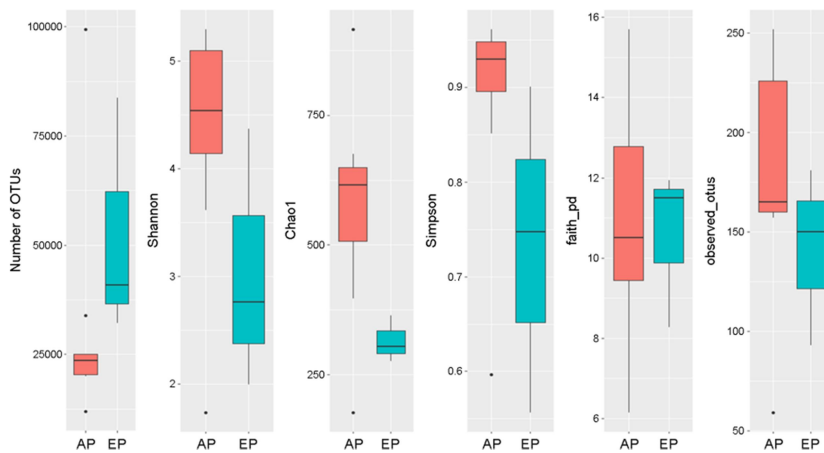


Fig. 4. Comparison of the Number of OTUs, Shannon, Chao1, Simpson, faith_pd, observed_otus values between Adélie Penguin (AP) and Emperor Penguin (EP).

주요 문이 분포하고 있음을 확인하였다. 그 중 아델리펭귄의 경우 Actinobacteriota, 황제펭귄의 경우 Fusobacteriota가 가장 많은 비율을 차지하고 있는 것으로 나타났다. 과(family) 수준의 분석 결과로는 아델리펭귄과 황제펭귄의 분변 시료에 18개의 주요 미생물 과가 분포되어 있음을 확인하였다. 아델리펭귄의 경우 채집 위치에 따라 다른 양상을 보였지만, Inexpressible Island에서 채집한 시료(ILAPP1)를 제외한 나머지 시료에서는 주로 Clostridiaceae와 Peptostreptococcaceae가 가장 높은 비율을 차지하는 것으로 관찰되었다. ILAPP1에서는 Anaerotruncaceae가 가장 높은 비율을 차지하는 것으로 확인되었다. 황제펭귄의 경우, Cape Washington과 Coulman Island에서 채집한 세 시료에서 모두 Fusobacteriaceae가 가장 높은 비율을 차지하고 있는 것으로 나타났다. 아델리펭귄과 황제펭귄의 분변 시료를 통해 얻은 미생물 종 분석 결과, 두 펭귄의 중간 장내 미생물 군집에 차이가 있음을 확인할 수 있었다. 또한 아델리펭귄의 경우 과 수준의 장내 미생물 구성이 서식

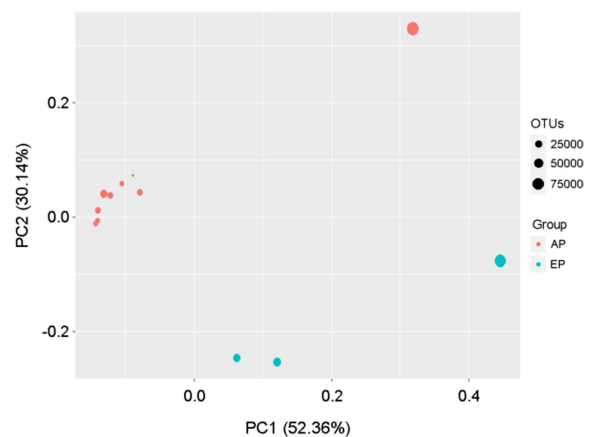


Fig. 5. Weighted Unifrac distance based PCoA plot of the OTU-level bacterial community composition of penguin's fecal samples. Each icon size is proportional to the number of OTUs.

지에 따라 상이한 것을 확인하였고, 황제펭귄의 경우 장내 미생물 구성이 서식지에 따라 큰 영향을 받지 않고 유사한 양상을 보이는 것으로 나타났다.

2.2 미생물 다양성 분석 결과

아델리펭귄과 황제펭귄의 분변 시료 내 미생물 군집에서의

OTU 개수의 분포와 함께 종 다양성 정도를 나타내는 Alpha diversity index 중 Shannon, Chao1, Simpson, faith_pd, 그리고 observed otus를 비교한 결과(Fig. 4), 아델리펭귄 그룹이 황제펭귄 그룹에 비해 분변 내 미생물 종의 다양성이 높은 것을 확인하였다. Beta diversity 분석은 Weighted Unifrac distance에 기반하여 시료 간의 유사도를 확인하였고 이를 주좌표 분석(PCoA)을 통해 나타내었다. 아델리펭귄과 황제펭귄의 OTU들이 각 그룹 별로 clustering 되는

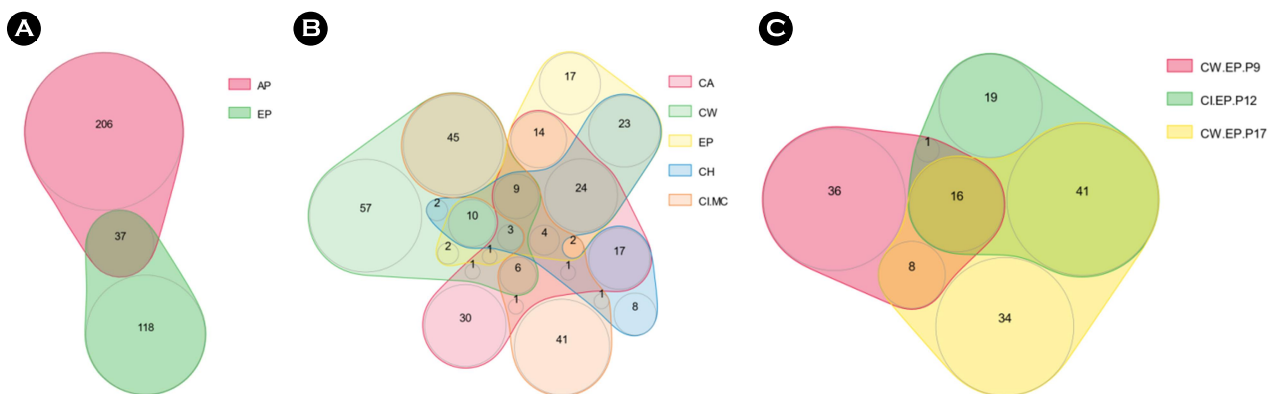


Fig. 6. (A) Venn diagram representing numbers of OTUs between Adélie Penguin (AP) and Emperor Penguin (EP). (B) Venn diagram representing the numbers of OTUs within Adélie Penguin (AP). (C) Venn diagram representing the numbers of OTUs within Emperor Penguin (EP).

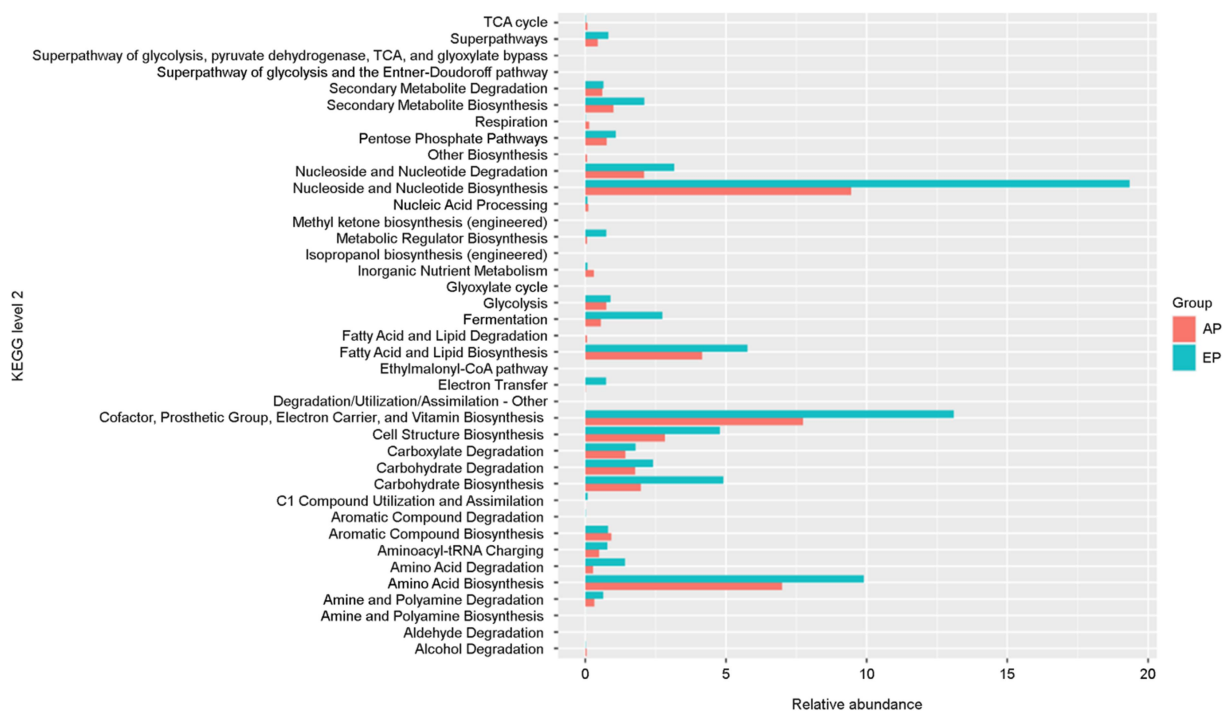


Fig. 7. Functional categories obtained with PICRUST for stability and exacerbation (KEGG database at level 2) between Adélie Penguin (AP) and Emperor Penguin (EP).

것으로 보아 그룹 간에 장내 미생물 군집에 차이가 있음을 확인하였다(Fig. 5). 아델리펭귄과 황제펭귄에서 관찰되는 OTU 수를 개체군 별, 시료 별로 비교 분석하기 위해 OTU abundance를 나타낸 벤 다이어그램을 활용하였다(Fig. 6). 아델리펭귄과 황제펭귄에서 공통적으로 나타나는 OTU 수는 37개로 확인되었으며, 아델리펭귄에서 특이적으로 확인된 OTU 개수는 206개, 황제펭귄에서 특이적인 확인된 OTU 개수는 118개로 나타났다(Fig. 6A). 아델리펭귄과 황제펭귄 간의 비교 외에도 각각의 개체 내에서 채집 위치 별로 OTU abundance를 비교한 결과, 모든 아델리펭귄에서 공통적으로 확인된 OTU 개수는 9개(Fig. 6B), 황제펭귄은 16개(Fig. 6C)로 나타났다. 이를 통해 아델리펭귄의 장내 미생물이 황제펭귄보다 종 다양성이 높은 것을 확인할 수 있었다.

2.3 장내 미생물 군총의 기능 차이 분석 결과

아델리펭귄과 황제펭귄의 분변 시료로부터 얻은 유전자 산물을 기반으로 대사 활동 경로 분석을 하기 위해 PICRUST를 활용하였다(Fig. 7). KEGG pathway 분석을 통해 아델리펭귄과 황제펭귄 시료에서 모두 nucleoside and nucleotide biosynthesis pathway가 가장 많이 존재하는 것을 확인하였다. 두 번째로는 Cofactor, Prosthetic Group, Electron Carrier, and Vitamin Biosynthesis에 대한 pathway가 많이 존재하였으며, 세 번째로는 Amino Acid Biosynthesis pathway가 그 뒤를 이었다. 채집된 지역에 따른 시료 별로 분석한 결과로는 CWEP17와 MCAPP19가 각각의 개체군을 대표하여 각 pathway에 대해 가장 높은 relative abundance를 보이는 것으로 확인되었다.

고 찰

남극 로스해 지역은 현재 해양생물자원과 해양생태계의 보존 및 관리를 위해 해양보호구역(Marine Protected Area, MPA)으로 지정되어 있다(Ballard et al., 2012). 로스해 해양보호구역의 보존 및 관리방안 수립에는 생태계 구조 및 기능에 대한 이해가 필수적인데, 현재까지도 이를 위한 다양한 연구와 노력들이 행해지고 있다. 특정 지역에 대한 연구를 위해서는 그 지역에 주로 서식하는 생물들에 대한 연구가 중요하다. 지난 연구에서는 로스해 해양보호구역의 생태계 구조와 기능 분석을 위해 10년간의 황제펭귄의 개체수 변화에 관한 연구(Kooyman and Ponganis, 2017), 환경 변화에 따른 아델리펭귄의 개체수 변화 예측(Ballerini et al., 2015) 등 로스해 지역에 서식하는 펭귄들에 대한 다양한 연구들이 행해졌다. 특히 아델리펭귄과 황제펭귄의 경우 많은 개체수가 로스해 지역에 서식하고 있기 때문에(Goetz et al., 2018; Zheng et al., 2022), 로스해에 서식하는 다양한 생물들을 대표하여 개체군 생태 연구를 수행할 가치가 있으며, 더 나아가 로스해 해양보호구역 생태계의 기능을 종합적으로 분석할 수 있다. 본 연구에서는 로스해

해양보호구역에 밀집된 아델리펭귄과 황제펭귄의 서식지로부터 분변 시료를 채집한 뒤, 이를 기반으로 아델리펭귄과 황제펭귄의 장내 미생물 군집을 분석하였다. 메타지놈 분석을 통한 장내 미생물의 다양성 분석 결과, 대체적으로 아델리펭귄이 황제펭귄보다 장내 미생물 중 다양성이 높음이 확인되었다. 또한 서식지에 따라 장내 미생물 군집 구성에 큰 차이를 보이지 않은 황제펭귄과는 달리, 아델리펭귄의 경우 장내 미생물 군집의 구성이 서식지에 따른 영향을 받아 지역별로 차이가 있음을 확인할 수 있었다. 각 펭귄들의 분변에서 얻은 유전자 산물로부터 PICRUST를 적용한 KEGG pathway 기반 유전자 기능 분석을 진행한 결과, 모두 nucleoside and nucleotide biosynthesis pathway가 가장 많이 존재하였으며 이 외에도 주로 생합성과 관련된 경로가 많은 비율을 차지하는 것이 확인되었다. 이 외에도 본 연구 결과는 아델리펭귄과 황제펭귄의 장내 미생물 구성과 그 다양성을 비교하고, 아델리펭귄과 황제펭귄의 먹이원 이용 및 취식전략을 확인하는 주요 자료로서 활용될 수 있는 데에 의미가 있다. 하지만 남극 대륙에 대한 접근의 한계성으로 인해 황제펭귄의 분변 시료가 아델리펭귄에 비해 상대적으로 적다는 부족함이 있다. 이를 보완하여 두 펭귄에 대한 더욱 정확한 분석을 위해 충분한 시료를 확보한 뒤 추가적인 연구를 진행할 필요가 있다. 또한 KEGG pathway 기반 유전자 기능 분석 결과 생합성과 관련된 경로들이 많은 비율을 차지하게 된 원인에 대해 자세히 분석할 가치가 있다. 지난 연구에서는 아델리펭귄과 황제펭귄의 어린 개체로부터 동위원소 분석을 진행하여 서식지 별 펭귄들의 먹이원을 비교 분석한 바가 있다(Hong et al., 2021). 후속 연구에는 아델리펭귄과 황제펭귄의 장내 미생물에 차이가 생긴 원인 중 하나로 먹이 섭식에 따른 영향을 받았을 것으로 예상하여 이에 대한 연구가 추가적으로 이루어져야 할 것이다. 또한 펭귄 외에도 남극 로스해 연안에 서식하는 다양한 생물에 대한 분석이 필요할 것이다. 로스해 해양보호구역의 종 다양성 및 생태계 구조 분석을 통해 최종적으로 기후 변화로 인한 환경 변화가 남극해 생태계에 미치는 영향과 해양생태계의 구조 및 기능을 파악할 수 있을 것이다.

사 사

이 연구는 해양수산부의 재원으로 해양수산과학기술진흥원의 지원을 받아 수행되었습니다(과제번호: KIMST 20220547).

참고문헌

- Ainley D, Russell J, Jenouvrier S, Woehler E, Lyver POB, Fraser WR, Kooyman GL. 2010. Antarctic penguin response to habitat change as Earth's troposphere reaches 2 °C above pre-industrial levels. *Ecological Monographs* 80: 49-66.
- Ballard G, Jongsomjit D, Veloz SD, Ainley DG. 2012. Coexistence of

- mesopredators in an intact polar ocean ecosystem: The basis for defining a Ross Sea marine protected area. *Biological Conservation* 156: 72-82.
- Ballerini T, Tavecchia G, Pezzo F, Jenouvrier S, Olmastroni S. 2015. Predicting responses of the Adélie penguin population of Edmonson Point to future sea ice changes in the Ross Sea. *Frontiers in Ecology and Evolution* 3: 1-11.
- Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, Alexander H, Alm EJ, Arumugam M, Asnicar F, et al. 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology* 37: 852-857.
- Burns JM, Kooyman GL. 2001. Habitat use by Weddell seals and emperor penguins foraging in the Ross Sea, Antarctica. *American Zoologist* 41: 90-98.
- Doney SC, Ruckelshaus M, Emmett Duffy J, Barry JP, Chan F, English CA, Galindo HM, Grebmeier JM, Hollowed AB, Knowlton N, et al. 2012. Climate change impacts on marine ecosystems. *Annual Review of Marine Science* 4: 11-37.
- Fadeev E, Cardozo-Mino MG, Rapp JZ, Bienhold C, Salter I, Salman-Carvalho V, Molari M, Tegetmeyer HE, Buttigieg PL, Boetius A. 2021. Comparison of two 16S rRNA primers (V3-V4 and V4-V5) for studies of arctic microbial communities. *Frontiers in Microbiology* 12: 637526.
- Fretwell PT, LaRue MA, Morin P, Kooyman GL, Wienecke B, Ratcliffe N, Fox AJ, Fleming AH, Porter C, Trathan PN. 2012. An emperor penguin population estimate: the first global, synoptic survey of a species from space. *PLoS One* 7: e33751.
- Goetz KT, McDonald BI, Kooyman GL. 2018. Habitat preference and dive behavior of non-breeding emperor penguins in the eastern Ross Sea, Antarctica. *Marine Ecology Progress Series* 593: 155-171.
- Hong S-Y, Gal J-K, Lee B-Y, Son W-J, Jung J-W, La H-S, Shin K-H, Kim J-H, Ha S-Y. 2021. Regional Differences in the Diets of Adelie and Emperor Penguins in the Ross Sea, Antarctica. *Animals* 11: 2681.
- Hopkins TL. 1987. Midwater food web in McMurdo Sound, Ross Sea, Antarctica. *Marine Biology* 96: 93-106.
- Huson DH, Weber N. 2013. Microbial community analysis using MEGAN. *Methods in Enzymology* 531: 465-485.
- Kooyman GL, Ponganis PJ. 2017. Rise and fall of Ross Sea emperor penguin colony populations: 2000 to 2012. *Antarctic Science* 29: 201-208.
- Lee J-Y, Mannaa M, Kim Y, Kim J, Kim G-T, Seo Y-S. 2019. Comparative Analysis of Fecal Microbiota Composition Between Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis Patients. *Genes* 10: 748.
- Lee Y, Ahn J-H, Choi Y-M, Weon H-Y, Yoon J-H, Song J. 2015. Bacterial core community in soybean rhizosphere. *Korean Journal of Microbiology* 51: 347-354.
- Michel LN, Danis B, Dubois P, Eleaume M, Fournier J, Gallut C, Jane P, Lepoint G. 2019. Increased sea ice cover alters food web structure in East Antarctica. *Scientific Reports* 9: 1-11.
- Millares L, Perez-Brocal V, Ferrari R, Gallego M, Pomares X, Garcia-Nunez M, Monton C, Capilla S, Monso E, Moya A. 2015. Functional Metagenomics of the Bronchial Microbiome in COPD. *PLoS One* 10: e0144448.
- Mohd Shaufi MA, Sieo CC, Chong CW, Gan HM, Ho YW. 2015. Deciphering chicken gut microbial dynamics based on high-throughput 16S rRNA metagenomics analyses. *Gut Pathogens* 7: 1-12.
- Moon J-G, Jung M-Y, Kim J-G, Park S-J, Kim D-S, Kim J-S, Rhee S-K. 2013. A Unique Prokaryotic Assemblage of Wall Biofilm of a Volcanic Cave (Daesubee) in Jeju. *Korean Journal of Microbiology* 49: 184-190.
- Quan J, Cai G, Yang M, Zeng Z, Ding R, Wang X, Zhuang Z, Zhou S, Li S, Yang H, et al. 2019. Exploring the Fecal Microbial Composition and Metagenomic Functional Capacities Associated With Feed Efficiency in Commercial DLY Pigs. *Frontiers in Microbiology* 10: 1-12.
- Smith Jr WO, Ainley DG, Arrigo KR, Dinniman MS. 2014. The oceanography and ecology of the Ross Sea. *Annual Review of Marine Science* 6: 469-487.
- Tabassum N, Lee J-H, Lee S-R, Kim J-U, Park H, Kim H-W, Kim J-H. 2022. Molecular Diet Analysis of Adelie Penguins (*Pygoscelis adeliae*) in the Ross Sea Using Fecal DNA. *Biology* 11: 182.
- Vallet C, Beans C, Koubbi P, Courcot L, Hecq J-H, Goffart A. 2011. Food preferences of larvae of Antarctic silverfish *Pleuragramma antarcticum* Boulenger, 1902 from Terre Adélie coastal waters during summer 2004. *Polar Science* 5: 239-251.
- Zheng Z, Nie Y, Chen X, Jin J, Chen Q, Liu X. 2022. Historical population dynamics of the Adélie penguin in response to atmospheric-ocean circulation patterns at Beaufort Island, Ross Sea, Antarctica. *Global and Planetary Change* 216: 103892.