**摘要**

微生物群落的相互作用在生态系统中研究广泛，解析维持微生物多样性的机制在生态系统中至关重要；

这种关于微生物共存的研究在包括食品的各种微生物发酵场景中也有广泛研究，然而，探究青贮饲料环境中微生物维持多样性的机制以预测复合菌剂青贮发酵动态变化还未有研究；

本研究为数字化设计菌剂并模拟青贮发酵菌群动态变化结果提供理论基础和技术。

**前言**

1. 微生物间的相互作用通常受到环境因素以及其他微生物存在的影响，物种数和相互作用强度影响菌群稳定性，导致持续波动。
2. 目前的问题是怎样通过预测菌株组合培养的结果应用于青贮发酵过程中菌群的动态变化。

试验设计



研究方法

1. 样品采集及内生菌菌种分离

采集内蒙古、河北、河南、湖南、四川等地区不同茬次初花期紫花苜蓿、全株青贮玉米为实验材料。用无菌剪刀苜蓿刈割并称重，接下来将表面菌和内生菌分离并分析化学成分。内生菌分离：首先用无菌水对叶表面冲洗干净，此部分冲洗液富集表面菌。接下来用次氯酸钠进行表面消毒，之后再用无菌水清洗冲洗。这次冲洗无菌水用于检验灭菌效果。将表面消毒后的材料放入

无菌研钵中充分研磨，之后加入 PBS 缓冲液充分搅拌，静置后取上清液进行涂布和DNA 提取。苜蓿表面菌的获取采用整株洗脱方法。将获取的菌液进行微生物培养和 PacBio 高通量测序。

1. 培养液选择、菌的定量混合、每日稀释、扩散

实验菌群在MRS肉汤培养液中培养，pH调节为6.5。实验开始前，需要定量测定菌种含量并等量混合。

每日稀释：两种菌匹配成一个群落，等体积混合单一培养后，将菌落初始混合，取20uL接种到600uL的MRS中，重复该过程，每个群落共产生3个生物重复。

扩散：在连续稀释循环下培养合成群落，分散如下。为达到10-6的分散速率，每24h等量混合，再按104倍稀释后，前2天将20uL的培养物转移到含有600uL新鲜培养液中，后5天将60uL的培养物转移到含有1800uL新鲜培养液中，进行30倍稀释。

试验延长至7个日循环。在每日周期结束时，使用Varioskan Flash 平板读取器，使用每种培养物的150uL样品测量OD (600nm)，这是培养物总生物量的代表。剩余的培养体积保存在-80°C，用于后续的16S测序及DNA提取。

1. 16S测序