الفصل الرابع

توصيف وتقسيم وتعريف الأحياء الدقيقة

Characterization, Classification and Identification of Microorganisms

يعد التوصيف والتقسيم والتعريف للكائنات من الأهداف الرئيسة في كل فروع العلوم الأحيائية.

ويعنى التقسيم وضع ترتيب للأحياء المتفرقة في الطبيعة، فبمجرد معرفتنا بخواص أي كائن يمكننا مقارنتها بالكائنات الأخرى من أجل أن نكتشف التشابهات similarities والاختلافات dissimilarities (differences) الموجودة بينها. ويميل العقل البشري إلى ترتيب الأشياء المتشابهة معاً في مجموعات وأن يميز distinguish هذه المجاميع واحدة عن الأخرى في كيانات مستقلة وأسماء محددة.

ولكي نُعرِّف ونُصنِّف الأحياء الدقيقة، فإننا يجب أن نعلم أولاً صفاتها، وأنه ليس من السهل عادة دراسة صفات كائن دقيق واحد وذلك لصغر حجمه. لهذا فإننا ندرس صفاته في مزرعة culture أي في مجتمع من الأحياء الدقيقة. فإذا درسنا صفاته في مزرعة تحتوي على العديد من الأحياء الدقيقة (عادة ملايين أو بلايين من نوع واحد فقط)، فإن هذا يناظر كما لو أننا ندرس هذه الصفات على كائن واحد. وكما ذكرنا سابقاً، فإن المزرعة التي تتكون من نوع واحد من الأحياء الدقيقة (نوع كائن حي واحد) بغض النظر عن عدد أفراده، في بيئة خالية من أية كائنات حية أخرى، فإن هذه المزرعة تسمى مزرعة نقية pure culture. ويقول قاطع، فهذه مزرعة نقية axenic culture. مع ذلك، فإن علماء الأحياء الدقيقة Microbiologists تعودوا بالإشارة إليها على أنها مزرعة نقية. وبهذا الجزم فإنه من مفهوم إجرائي technical sense، فإن المزرعة النقية هي تلك المنماة من خلية مفردة.

إن تحديد خصائص الأحياء الدقيقة ليس فقط متطلباً مسبقاً prerequisite للتقسيم لكنه يجري لأسباب أخرى أيضاً. وكما أشرنا سابقاً، فإن الأحياء الدقيقة تلعب العديد من الأدوار المهمة بل الأساسية حقاً، في الطبيعة. لذلك فإنه من الضروري أن نحدد الخصائص للنوع التي تُمكِّن من إحداث النشاطات الحيوية للكائن.

الخصائص الرئيسة للأحياء الدقيقة

Major Characteristics of Microorganisms

تقع الخصائص الرئيسة للأحياء الدقيقة فيما يلي:

١- الخصائص الشكلية Morphological characteristics: شكل الخلية، وحجمها وتركيبها، وترتيب الخلايا، ووجود تراكيب خاصة والصور التكشفية developmental-forms وتفاعلات الصبغات، والحركة motility وترتيب الأسواط flagella.

٢- التركيب الكيميائي Chemical composition: ويضم مختلف التراكيب الكيميائية للخلية.

٣- الخصائص المزرعية Cultural characteristics: مثل الاحتياجات الغذائية والظروف الطبيعية المطلوبة للنمو، والطريقة التي يحدث بها النمو.

٤- الخصائص الأيضية Metabolic characteristics: وتمثل الطريقة التي تحصل بها الخلايا على طاقتها وكيفية استخدامها والتفاعلات الكيميائية التي تحدث فيها وكيف تنظم regulate هذه التفاعلات.

٥- خصائص مولّدات الأنتيجينات (مولّدات الضد) Antigenic characteristics: وهي مكونات التراكيب الكيميائية الكبيرة الخاصة (النوعية) والمميزة distinctive لأنواع معينة من الميكروبات. ويمكن بهذه الطريقة التعرف على جنس ونوع وسلالة الكائن الدقيق بدقة قاطعة.

٦- الخصائص الوراثية Genetic characteristics: وهي خصائص المادة الوراثية Hereditary material للخلية (حامض الريبونيوكليك منزوع الأوكسيجين، ح.ن.د (د.ن.أ) D.N.A = Deoxy ribonucleic acid) ووجود وظيفة وأنواع أخرى من د.ن.أ (D.N.A) التي قد توجد مثل البلازميدات plasmids.

٧- الإمراض Pathogenicity: وهي قدرة الكائن على إحداث مرض disease لمختلف النباتات والحيوانات وغيره من الأحياء الدقيقة.

٨- الخصائص البيئية Ecological characteristics: وتعنى بالبيئة habitat وبتوزيع distribution الكائن في الطبيعة والتفاعلات بين مختلف الأنواع species في الأوساط البيئية environments الطبيعية.

أولاً: الخصائص الشكلية Morphological Characteristics

على خلاف الخصائص الميكروبية الأخرى، فإن تحديد الخصائص الشكلية يحتاج عادة لدراسة خلايا مفردة individual لمزرعة نقية من الكائن. والأحياء الدقيقة صغيرة جداً ويعبر عادة عن أحجامها بالميكروميترات (µm) micrometers. والميكروميتر الواحد يكافيء ٠٫٠٠١ من المليميتر (mm). لذلك يحتاج الفحص المستمر (الروتيني) للخلايا الميكروبية استخدام القوة الكبرى للمجهر الضوئي، أي عند قوة تكبير نحو ١٠٠٠ مرة.

أما استخدام المجهر الإلكتروني فإنه يعطي قوة تكبير آلاف المرات ويجعل من الممكن رؤية التفاصيل الدقيقة لتركيب الخلية. وتوجد عدة تقنيات وطرق متاحة للفحص المجهري للأحياء الدقيقة. وتتوقف التقنيات المختارة على المعلومات المراد الحصول عليها. وقد سبق وصف بعضها. أما بالنسبة للأحياء الدقيقة غير البكتيرية كالطحالب والفطريات فتدرس مظهرياً بالمجاهر المختلفة، على حين أن الفيروسات لا تدرس إلا بالمجاهر الإلكترونية.

ثانياً: الخصائص الكيميائية Chemical Characteristics

تتكون الخلايا الميكروبية من مدى متباين من المواد العضوية. وعندما تكسر الخلايا إلى أجزاء ثم تعرض محتوياتها للتحليل الكيميائي، فإن كل نوع من الأحياء الدقيقة وجد أن له مكوناته الكيميائية المميزة. وتحدث كلاً من الاختلافات النوعية qualitative والكمية quantitative في التكوين الكيميائي بين مختلف الأنواع species. فعلى سبيل المثال، فإن وجود عديدات السكر الدهنية lipopolysaccharides في جدر الخلايا يكون صفة مميزة للبكتيريا السالبة لجرام وليس الموجبة لجرام. وعلى النقيض من ذلك، فإن العديد من البكتيريا موجبة الجرام لها جدر خلوية تحتوي على حمض تيكويك teichoic acid وهو مركب لا يوجد في البكتيريا سالبة الجرام. أما جدر الخلايا الفطرية والطحلبية فإنها مختلفة تماماً في تكوينها عن تلك الخاصة بالبكتيريا. أما التفريق الأساسي بين أنواع الفيروسات فإنه يبنى على أساس نوع الحامض النووي nucleic acid التي تحتويها والتي تسمى الحامض النووي الريبي ribonucleic acid (ح.ن.ر = ر.ن.أ RNA) الحامض والحمض النووي الريبي منزوع الأوكسيجين deoxy ribonucleic acid (ح.ن.د = د.ن.أ DNA).

ثالثاً: الخصائص المزرعية Cultural Characteristics

لكل نوع من الأحياء الدقيقة إحتياجات نمو خاصة. فالعديد من الأحياء الدقيقة تنمو في أو على وسط زراعة culture medium (وهو خليط من المُغذّيات nutrients المستخدمة في المعمل لتدعيم نمو وتكاثر الأحياء الدقيقة). وتستطيع بعض الأحياء الدقيقة أن تنمو في وسط يحتوي على مركبات عضوية (الأحماض الأمينية، والسكريات، والبيورينات purines والبريميدينات pyrimidines والفيتامينات والمرافقات الإنزيمية coenzymes) ويحتاج البعض الآخر إلى مواد عضوية معقدة (البيتون peptone وخلاصة تحلل الخميرة yeast auto lysate وخلايا الدم، أو مصل serum الدم). على حين أن مجموعة أخرى من الكائنات لا تستطيع أن تنمو أبداً على أي وسط معملي صناعي ولكن يمكن تنميتها فقط في عائل حي أو خلايا حية، مثالاً لذلك: الريكيتسيا rickettsias والفيروسات viruses التي تحتاج إلى عائل حي لتتكاثر فيه مثل الحيوان، أو بيض الدجاج embryonated eggs (جنين الدجاج chick embryo) أو المفصليات arthropods أو في مزارع لأنسجة خلايا الثدييات الدقيقة.

ويقوم العائل بتأدية وظيفته على أنه "وسط" معقد جداً لتلبية الاحتياجات الغذائية لهذه الأحياء وعلاوة على المغذيات النوعية، فإن كل كائن يحتاج أيضاً إلى عوامل طبيعية خاصة لنموه. فبعض البكتيريا مثلاً تنمو أفضل عند

درجة حرارة عالية ولا يمكنها أن تنمو عند أقل من درجة ٤٠°م، والبعض الآخر ينمو أفضل عند درجات البرودة ولا تستطيع أن تنمو عند أعلى من درجة ٢٠°م على حين تبقى مجموعة من الكائنات المُمْرضة للإنسان "بكتيريا، وفطريات، وفيروسات، وأوليات وتحتاج في نموها إلى درجة حرارة قريبة من درجة حرارة الإنسان (أي ٣٧°م). كذلك، فإن الجو الغازي gaseous atmosphere المطلوب للنمو يعد مهماً أيضاً، فمثلاً تحتاج بعض البكتيريا في نموها إلى الأوكسيجين، بينما يكون الأوكسيجين قاتلاً lethal للبعض الآخر، وتستطيع أن تنمو فقط في غيابه. كما أن الضوء Light قد يكون العامل الطبيعي الثاني المهم، فبكتيريا معينة مثل البكتيريا المزرقة (الزرقاء) cyanobacteria تحتاج للضوء كمصدر للطاقة، بينما قد يكون الأمر سيَّان indifferent للبعض الآخر فيمكن أن يتعرض للضوء أو لا يتعرض له، وربما يكون الضوء ضاراً deleterious لنمو مجموعة أخرى.

ولكل نوع من الأحياء الدقيقة طريقة manner نمو مميزة. فعلى سبيل المثال، قد ينمو في الوسط السائل liquid medium بوفرة abundant أو بقلة sparse أو قد يتوزع متجانساً evenly dispersed خلال الوسط أو يتكون كترسيب sediment في القاع أو على صورة غشاء رقيق (pellicle = thin film) على القمة. أما على الوسط الصلب solid medium فتنمو الميكروبات في صورة مستعمرات colonies مميزة ككتل متراصة من الخلايا بحيث يمكن رؤيتها بالعين macroscopically visible. وتتميز المستعمرات بحجمها size، وشكلها shape، وتكوينها texture، وتجانسها consistency، واللون والملامح المرئية الأخرى (انظر الشكل رقم ٢٢).

الشكل رقم (٢٢). نمو الأحياء الدقيقة على هيئة مستعمرات على الآجار المغذي عقب تعرض أطباق بتري منه لهواء الغرفة ثم تحضينها (عن: Pelczar, *et al.*, 1993).

رابعاً: الخصائص الأيضية Metabolic Characteristics

تعد العمليات الحيوية في الخلية الميكروبية سلاسل متكاملة معقدة من التفاعلات الكميائية التي يشار إليها كلية بالأيض metabolism. وتوفر هذه التفاعلات المتنوعة العديد من الفرص لتوصيف characterize مختلف مجموعات الأحياء الدقيقة والتفريق بينها. فعلى سبيل المثال، تحصل بعض الكائنات على الطاقة بامتصاص الضوء، والبعض الآخر يحصل عليها من الأكسدة لمختلف المواد العضوية وغير العضوية، على حين أن مجموعة أخرى تحصل عليها من إعادة توزع redistributing الذرات خلال جزيئات معينة، ومن ثم فإن هذه الجزيئات تصبح أقل ثباتاً.

كما تختلف الكائنات أيضاً في الطرق التي تُخلّق synthesize مكوناتها الخلوية أثناء النمو. وتحفز catalyzed مختلف التفاعلات الكيميائية لأي كائن بروتينات معينة تسمى خمائر أو إنزيمات enzymes. وتختلف مجموعة الإنزيمات التي يمتلكها أي كائن اختلافاً واضحاً عن تلك التي يمتلكها أي كائن آخر، هذا فضلاً عن الاختلاف في الطرق التي يتم بها تنظيم regulation عمل هذه الإنزيمات.

خامساً: خصائص مولدات الأضداد (الأنتيجينية) Antigenic Characteristics

تسمى بعض المركبات الكيميائية المعينة للخلايا الميكروبية مولّدات أضداد (أنتيجينات antigens أو أجسام غريبة). وللتوصيف الأنتيجيني للأحياء الدقيقة أهمية عملية عظيمة. فإذا دخلت أو أدخلت الخلايا الميكروبية إلى جسم حيوان فقاري، فإن الحيوان يستجيب لهذه الأنتيجينات "المواد الغريبة foreign substances" بتكوين بروتينات نوعية في مصل الدم blood serum تسمى أجسام مضادة antribodies والتي ترتبط bind مع مولدات الأضداد نوعيا. وتعد الأجسام المضادة عالية التخصص لمولدات المضادات (للأنتيجينات) التي استحثت تكوينها.

ولأن مختلف أنواع الكائنات الحية الدقيقة تمتلك أنواعاً مختلفة من مولدات الأضداد (أنتيجينات)، لذلك فإن الأجسام المضادة تستخدم على نطاق واسع كأدوات للتعرف السريع على أنواع معينة من الأحياء الدقيقة. ويشبه هذا النظام من التفاعل النوعي بين مولد المضاد والجسم المضاد الخاص القفل والمفتاح نظراً للطبيعة النوعية الخاصة العالية في هذا التفاعل. فإذا كنا نعرف هوية واحد من جزئي نظام التفاعل أي مولد المضاد (الأنتيجين) أو الجسم المضاد، فإن ذلك يمكننا من أن نتعرف على الجزء الآخر. فمثلاً، إذا أخذنا الجسم المضاد لبكتيريا التيفويد وخلطناها مع معلق محلول مجهول من خلايا بكتيرية فعند حدوث تفاعل موجب، فإنه يمكن أن نستنتج أن الخلايا هي تلك الخاصة بكائن التيفويد. أما عندما لا يحدث تفاعلاً فإن هذه الخلايا البكتيرية تكون لأنواع أخرى غير بكتيريا التيفويد.

كذلك أيضاً فإن هذا الاختبار إذا أجرى بطريقة الانتشار المزدوج في الأجاروز agarose فإنه يمكن أن يحدد العلاقة بين كائنين فإما أن يوجد تطابقاً تاماً أو تطابقاً جزئياً أو لا توجد علاقة بالمرة. كما يمكن الحصول على هذه النتائج باستخدام مجهر الوميض (الفلوريسيني) مع أجسام مضادة وميضة أو أنتيجينات وميضة ثم فحصها تحت المجهر وتعريضها لمصدر ضوء من الأشعة فوق البنفسجية.

سادساً: الخصائص الوراثية Genetic Characteristics

إن المادة الوراثية في كل الكائنات الحية الخلوية عبارة عن د.ن.أ (دى.إن.إيه DNA) في شكل كروموزومات (واحداً أو أكثر على حسب نوع الكائن). وتتميز الفيروسات بأنها لا خلوية وتوجد مادتها الوراثية إما على شكل د.ن.أ (DNA) أو ر.ن.أ (آر.إن.إيه RNA) في جزيء أو جزيئات مفردة أو مزدوجة الخيط.

هذا ويتميز د.ن.أ مزدوج الخيط في الأحياء الدقيقة الخلوية بوجود صفات معينة تكون ثابتة ومميزة لهذا الكائن عن غيره ويمكن استخدامها في تقسيمه، على النحو التالي:

١- تكوين قواعد ح.ن.د (د.ن.أ) DNA base composition

إنه من المهم معرفة أن جزيء د.ن.أ يتكون من أزواج من القواعد النيتروجينية: جوانين guanine، سايتوسين cytosine، وأدينين adenine، وثايمين thymine. ويطلق على النسبة المئوية لأعداد نيوكليوتيدات nucleotides الجوانين والسيتوسين G + C بالنسبة للنيوكليوتيدات الكلية الموجودة في د.ن.أ على أنها القيمة الجزيئية المئوية لمجموع الجوانين + السايتوسين (mol % G+C). وتتراوح هذه القيم للكائنات المختلفة ما بين ٢٣ إلى ٧٥. ومن أمثلة ذلك أزوسبايريللام برازيلينز *Azopirillum brasilense* (٧٠-٧١٪)، أزوسبايريللام لايبوفيرام *A. lipoferum* (٦٩-٧٠٪)، وفي كامبايلو باكتر فيتاس *Campylobacter fetus* (٣٢-٣٥٪)، وكامبايلوباكتر جيجيوني *C. jejune* (٣١٪)، وفي كليبسيللا بنيموني *Klebsiella pneumoniae* (٥٦-٥٨٪) وفي كليبسيللا تريجينا *K. terrigena* (٥٧٪)، وفي بكتيريا السيلان ونيسيريا جونوريي *Neisseria gonorrhoeae* (٥٠-٥٣٪)، ونيسريا إلونجاتا *N. elongata* (٥٣-٥٤٪)، وفي سيدوموناس إيريوجينوزا *Pseudomonas aeruginosa* (٦٧٪) وسيدوموناس سيكورياي *P. cicorati* (٥٩٪).

٢- تتابع قواعد النيوكليوتيدات في د.ن.أ The sequence of nucleotide bases in the DNA

يعد تتابع النيوكليوتيدات للمادة الوراثية لأي كائن حي فريداً بذاته دون غيره. وهذه الخاصية هي أهم الخصائص على الإطلاق لأي كائن، ولهذا السبب فإن هذه الخاصية لها دلالة معنوية كبرى في تقسيم الميكروبات.

وبالإضافة إلى د.ن.أ DNA الذي يوجد في الكروموزومات، فإن د.ن.أ البلازميد plasmid DNA قد يوجد أحياناً في الخلايا الميكروبية. والبلازميدات plasmids عبارة عن جزيئات دائرة (حلقية) مغلقة من د.ن.أ مزدوج (d s D N A) لها قدرة ذاتية على التكاثر autonomous replications داخل الخلايا البكتيرية. وقد يضفي وجود البلازميدات بعض الصفات الوراثية على الخلايا التي تحتويها، مثل قدرتها على صنع سموم toxins (توليد السمية toxogenicity) ومن ثم تصبح أكثر مقاومة لمختلف المضادات الحيوية antibiotics أو أن تكتسب البكتيريا صفات أخرى كمقدرتها على استخدام مواد كيميائية غير عادية كمغذيات.

سابعاً: الخصائص الإمراضية Pathogenicity

إن قدرة بعض الأحياء الدقيقة على إحداث مرض أو أمراض يعد بالتأكيد من أكثر أهم الصفات خطورة، مما حفز أن تجرى دراسات وأبحاث عديدة مبكرة على هذه الأحياء الدقيقة المسببة للأمراض. وعلى الرغم من أننا نعرف الآن أن عدداً قليلاً من هذه الكائنات يسبب أمراضاً، إلا أن بعض هذه الأحياء الدقيقة تعد مُمْرِضة للإنسان والحيوان، والنباتات. كما أن بعضها قد يسبب أمراضاً لأحياء دقيقة أخرى. فمثلاً، البكتيريا المعروفة باسم ديللوفبريوز bdellovibrios تعد مفترسة predatory لأنواع أخرى من البكتيريا، والفيروسات المعروفة بالبكتيريوفاجات bacteriophages يمكن أن تُعْدي infect وتدمر الخلايا البكتيرية.

ثامناً: الخصائص البيئية Ecological Characteristics

إن بيئة الكائن الحي الدقيق تعد مهمة في توصيف هذا الكائن. فعلى سبيل المثال، فإن الأحياء الدقيقة التي توجد عادة في البيئات البحرية marine تختلف بصفة عامة عن تلك التي توجد في بيئات المياه العذبة. وأن المجتمع الميكروبي الموجود في التجويف الفمي يختلف عن ذلك الذي يوجد في القناة الهضمية. وتنتشر بعض الميكروبات على نطاق واسع في الطبيعة، على حين أن البعض الآخر قد يكون وجوده قاصراً على بيئة معينة. وقد تكون العلاقة بين الكائن وبيئته معقدة كما أنها قد تتضمن بعض الصفات المميزة للكائن والتي قد لا تكون معروفة حتى الآن.

تقسيم الميكروبات، وتسميتها وتعريفها
Microbial Classification, Nomeclature and Identification

حالما تتحدد خصائص الأحياء الدقيقة ثم تُجَمَّع وتُرتَّب بدقة فإن عملية تقسيمها يمكن أن تبدأ.

التقسيم Classification

استخدمت كلمة تاكسا taxa (وهي تعني مصنفة) لتشير مبدئياً إلى ما يعنيه الآن مصطلح سلالة strain. والسلالة تتشكل من كل نسل descendants أية مزرعة نقية، والتي هي في الأساس مزرعة مشتقة من مستعمرة واحدة نقية. ولكل سلالة ميكروبية تاريخ خاص وترقيم معين.

المجموعات التقسيمية (تاكسا) Taxonomic Groups

إن المجموعة التقسيمية الأساسية هي (تاكسون taxon) وهي النوع species بمعنى أنها مجموعة من السلالات strains لها نفس الخصائص الأصيلة للنوع type strains أي السلالة الممثلة prototype strain لكل السلالات المشابهة لها.

وكما هو الحال بالنسبة للأنواع البكتيرية من حيث كونها مجمّعة لكل السلالات المتشابهة، فإن الجنس Genus في البكتيريا، وكثير من الأحياء الدقيقة الأخرى، يتكون من مجموعة من الأنواع المتشابهة. ويخصص واحداً من هذه الأنواع ليعرف بأنه النوع الأصيل. typespecies أي الممثل لكل الأنواع والذي يعد كمثال دائم للجنس.

يلي ذلك ترتيب أجناس البكتيريا في مجموعات أعلى مثل القافلة (العائلة) family التي تمثل مجموعة متشابهة من الأجناس، والرتبة order والتي تمثل مجموعة متشابهة من العائلات، والطبقة class والتي تمثل مجموعة متشابهة

من الرتب، والقسم division الذي يضم الطبقات المتشابهة، ثم يلي ذلك تحت المملكة subkingdom والمملكة Kingdom. ومن الجدير بالذكر أن علماء التصنيف taxonomists يضعون في اعتبارهم نقطتين هامتين هما:

أ) الثبات stability إذ يجب ألا يتعرض نظام التقسيم إلى التغيير المستمر؛ وإلا أدى ذلك إلى التشوش والالتباس. لكن أي محاولة للتغيير أو لإعادة الترتيب والتفنيط shuffling يجب أن تتم لتطوير التقسيم الذي يحتاج إلى تغيير طفيف؛ وذلك عندما تتاح معلومات جديدة.

ب) التنبؤية Predictability: إن معرفة خصائص كل كائن تمكن من التنبؤ أو التوقع بانتمائه لأية مجموعة تصنيفية، حيث يجب أن يكون من المفترض أن للكائنات الأخرى من نفس المجموعة، خصائص متشابهة، فإذا لم يكن ذلك ممكناً فإن عملية التصنيف تصبح من أساسها بدون جدوى.

الطرق العامة المتبعة في تقسيم الأحياء الدقيقة
General Methods of Classifying Microorganisms

١- الطرق التقليدية Classical Methods

وهي أن عالم الأحياء الدقيقة يدرس العزلات isolates التي يفحصها سواءً أكانت قديمة أم جديدة ويحاول تجميع كل الصفات والخواص العامة والدقيقة المتعلقة بها ويقارنها بالمعلومات المتوفرة عن غيرها من قبل ويقرّب بين هذه العزلات ليحدد ما إذا كانت أفرادها جديدة novelle أو أنها مسجلة recorded قبل ذلك، ثم يضعها في موضعها من نظام التقسيم المتفق عليه. وأما إذا كان الكائن جديداً ويستحق أن يوضع في مجموعة تقسيمية جديدة أو ينتقل إلى مجموعة أقرب لها فإن ذلك يستحق، بعد الإثبات العلمي، موافقة الهيئة العلمية الدولية للتصنيف على المكتشفات الجديدة في هذا الشأن.

٢- التصنيف العددي Numerical Taxonomy

من أجل تحقيق الموضوعية في تجميع وتقسيم البكتيريا والأحياء الدقيقة عموماً، فإنه يلزم على العالم أن يحدد صفات كثيرة (عادة ١٠٠ أو ٢٠٠ صفة) لكل سلالة تحت الدراسة وأن يرصد لكل صفة وزناً مساوياً لغيرها. ويعد ذلك يستخدم الحاسب الآلي (كمبيوتر computer) لحساب النسبة المئوية المتشابهة similarity % لكل سلالة بالنسبة لكل السلالات الأخرى. ويكون الحساب لكل سلالتين كما يلي:

$$\text{النسبة المئوية للتشابه (S \%)} = \frac{\text{عدد الصفات المتشابهة}}{\text{عدد الصفات المتشابهة + عدد الصفات غير المتشابهة}}$$

$$S\ \% = \frac{NS}{NS + ND}$$

حيث إن NS = عدد الصفات المتشابهة ، وND = عدد الصفات المختلفة (different). فإذا كان لهاتين السلالتين نسبة مئوية من التشابه عالية بالنسبة لبعضها عن بعض فإنهما توضعان في مجموعة ومن ثم فإن المجموعات ذات نسبة التشابه العالية بالنسبة لبعضها البعض توضع بالتالي في مجموعات أكبر وهكذا.

ويمكن لعالم التصنيف أن يحدد بهذه الطريقة درجة التشابه اللازمة لوضع أي مجموعة كنوع species أو جنس genus أو أي مجموعة تقسيمية (تاكسون taxon) . وتعد هذه الطريقة من التصنيف بأنها ذات فائدة عملية كبيرة كما أنها تعد نسبياً غير متحيزة unbiased في مفهومها، علاوة على أنها تعطي تصنيفات ذات درجة عالية من الثبات والتوقع.

٣- القرابات الوراثية Genetic Relatedness

الطريقة الثالثة والأكثر وثوقاً في التصنيف هي تلك المبنية على درجة القرابة الوراثية بين الكائنات. وتعد هذه أكثر الطرق موضوعية ؛ لأنها معتمدة على أهم الجوانب الرئيسة لأي كائن ، أي مادته الوراثية د.ن.أ (DNA). وقد ساهم منذ ١٩٦٠م علم الأحياء الجزيئية Molecular Biology في تقديم تقنيات يمكن بها مقارنة د.ن.أ لأي كائن بنظيره من الكائنات الأخرى. فلأول وهلة يمكن عمل هذه المقارنة على أساس النسبة المئوية الجزيئية للجوانين + السايتوسين (Mol G+C %). فالحقيقة أن أي كائنين لنفس النوعية أو نوعين متشابهين فإنهما يبديان تشابهاً كبيراً في النسبة المئوية للجوانين + السايتوسين. أما الكائنات ذات النسبة المئوية المختلفة فلابد أن تكون مختلفة عن بعضها من الكائنات. ومع ذلك، فإنه يلزم التنويه على أن بعض الكائنات قد تكون متشابهة في هذه النسب المئوية ولكنها غير ذات صلة قرابة. ومن ثم، فإنه يلزم استخدام طريقة أكثر دقة وتحديداً مثل طريقة مقارنة تتابع القواعد النيتروجينية. ويعد هذا التتابع هو أكثر الصفات دقة لأي كائن. وقد مكنت التقنيات الحديثة من عمل هذه المقارنات. ويعتمد أساس هذه الطرق على ما يلي :

أ) تجارب تجانس د.ن.أ DNA homology experiments

وفيها يسخن د.ن.أ مزدوج الخيط double stranded DNA لكلا الكائنين المراد دراسة قرابتهما، وبذلك يتحول د.ن.أ إلى خيوط مفردة. يلي ذلك خلط د.ن.أ مفرد الخيط من كائن مع نظيره من الكائن الثاني ويسمح لهما بالتبريد. فإذا كان الكائنان ذوي قربى closely related فإنهما يكوّنان معاً خيوطاً مزدوجة متباينة hetero duplexes. وبمعنى آخر، فإن خيطاً من كائن سوف يزدوج pair مع خيط من الكائن الثاني. أما إذا كان الكائنان غير ذوي قربى (مختلفين تماماً)، فإن هذه الخيوط المزدوجة المتباينة لن تتكون. وتفيد هذه الطريقة في التصنيف على مستوى الأنواع.

ب) تجارب تجانس ر.ن.أ الريبوزومي ومواصفات نيكليوتيدات ر.ن.أ الريبوزمي

Ribosomal RNA homology and ribosomal RNA cataloging

إن ثمة كائنين يمكنهما أن يكونا قريبين ولكنها قرابة ليست بنفس الدرجة التي تعطي مستوى عالياً من تجانس د.ن.أ (DNA)، ومع ذلك، فلا زال بينهما درجة ما من القرابة. والريبوزومات عبارة عن عضيات صغيرة ذات

تركيب حبيبي توجد داخل الخلية كمصنع للبروتين. وهي تتكون من البروتين و ر.ن.أ (RNA)، ويشفر له ر.ن.أ الريبوزمي rRNA بجزء صغير فقط من د.ن.أ يسمى تتابعات ر.ن.أ الريبوزومي rRNA cistorns. وفي كل البكتيريا التي درست حتى الآن وجد أنه أثناء التطور تغيرت تتابعات النكليوتيدات لوحدها أكثر مما تغير د.ن.أ ككل. وهذا يعني أنه حتى لو كانت هناك علاقة قرابة بعيدة distantly related بين كائنين ولا يبديان أية درجة من تجانس د.ن.أ، إلا أنه يمكن أن يظل هناك تماثل إلى حد ما بين ترتيب تتابعات ر.ن.أ الريبوزومي. ويمكن استخدام درجة التشابه الموجودة لقياس درجة القرابة بين كائنين ولكن ليس على مستوى النوع species (ربما يكون على مستوى الجنس Genus أو العائلة Family أو الرتبة Order ... إلخ).

إن تجارب تجانس ر.ن.أ ومواصفات نيكليوتيدات ر.ن.أ تعدان طريقتان حديثتان تستخدمان لتحديد درجة التشابه بين تتابعات ر.ن.أ الريبوزمي للكائنات المختلفة. ولكن هاتين الطريقتين معقدتان وتستخدمان فقط في قلة من المعامل.

التعريف Identification: إن أي كائن لابد وأن يصنَّف قبل أن يتم تعريفه ، أي أن يعطى اسماً علمياً. وهذا حقيقي حتى ولو كان التصنيف ما هو فقط إلا عملية التعرف recognition على أن الكائن مختلف عن أي كائن آخر. فعلى سبيل المثال، هذا ما حدث للعامل المُمْرض والمسبب لبجنيرز Legionnaires والذي أحدث وباء الالتهاب الرئوي المشهور في فيلاديلفيا عام ١٩٧٦م. وكأن هذا الكائن لم يكن كأي بكتيريا أخرى كالنوع المعروف والمسمى ليجينيرز نيموفيللا *Legionnaires pneumophilla*. فبمجرد تقسيم الكائن، نختار بعض صفاته والتي يمكن بها أن يتعرف عليها أي عالم ميكروبيولوجي. ولكي تكون هذه الصفات سهلة في عملية التعرف فإن مجموعة المميزات المختارة يجب أن توجد فقط في هذا الكائن وليس في أي كائن سواء. كما أن المميزات يجب أن تكون هي تلك التي يسهل تحديدها، مثل الشكل، وتفاعلات الصبغة، وتخمرات السكريات sugar fermentations ...إلخ. فمثلاً تجارب تجانس د.ن.أ، على الرغم من أنها مفيدة جداً في تقسيم أي كائن، لكنها تكون غير مُرْضية في العمل الدائم (الروتيني) routine للتعرف على الكائن بسبب تعقيد هذه الطريقة.

وتكون العديد من طرق schemes التعريف على صورة مفاتيح keys، والتي توضح فيها المميزات التعريفية وفي ترتيب منطقي متتابع. كما أن جداول التعريف ientification tables تعد أيضاً مفيدة وعادة ما تحتوي على خصائص أكثر مما هو في المفاتيح، علاوة على أن المعلومات التي تحتويها توضع بحيث يسهل قراءتها في صورة ملخصة.