

تأثير أشعة المايكروويف على التوزيع النتروجيني وبعض الخواص الفيزيائية والمحتوى المايكروبي لحليب الأغنام

موفق محمد علي
حماد صالح البدراني
نيهان بهاء الدين
كلية الزراعة والغابات - قسم علوم الأغذية - جامعة الموصل - الموصل - العراق

الخلاصة

تم تعريض حليب الأغنام لأشعة المايكروويف لمدة ٦٠ و ٩٠ و ١٢٠ و ١٥٠ و ١٨٠ ثانية، ثم حلل الحليب المعامل لمعرفة التوزيع النتروجيني والأس الهيدروجيني وزمن التجبن، بالإضافة إلى العدد الكلي البكتيري و بكتريا القولون والعنقوديات الذهبية وبكتيريا السالمونيلا. قللت المعاملة بالأشعة من الحمولة البكتيرية للحليب، بالإضافة إلى حدوث دنثرة جزئية لبروتينات الشرش، وارتفاع النتروجين الكازيني والنتروجين غير البروتيني والاس الهيدروجيني، والى تأخر تجبن الحليب بالمنفعة.

المقدمة

تستخدم أشعة المايكروويف في تحضير كثير من المنتجات الغذائية، سواء كانت صلبة أو شبه صلبة أو سائلة بالإضافة إلى قيامها بعمليات الإذابة والتسخين والتعقيم (Goldblith، ١٩٦٦). أن أهم ما يميز هذه الأشعة هو السرعة في عمليات إجراء التسخين أو الطبخ. قد نال استخدام أشعة المايكروويف في الأغذية حيزاً كبيراً من الدراسات والبحوث، في حين إن استخدامها في الحليب السائل وبعض منتجات الألبان لم ينل إلا حيزاً ضئيلاً من الدراسة. ومنها استخدام المايكروويف في تقدير المواد الصلبة الكلية في الحليب وبعض منتجاته واعتبرت من الطرق السريعة لهذا التقدير (Ozurec، ١٩٨٩، Makarchuch وآخرون، ١٩٩١). أن استخدام المايكروويف لا يخلوا من بعض المساوئ فقد ذكر Lita (١٩٩١) أن تسخين حليب الرضع في قناني الرضاعة أدى إلى حدوث فقد في بعض الفيتامينات والمعادن وعوامل المناعة في الحليب. لذلك فقد هدفت الدراسة الحالية إلى معرفة تأثير هذه الأشعة على التوزيع النايتروجيني وبعض الخواص الفيزيائية على حليب الأغنام. كذلك معرفة تأثير الأشعة على العدد الكلي للبكتيريا وبكتريا القولون والعنقوديات الذهبية وبكتيريا السالمونيلا.

مواد البحث وطرائقه

جمع العينات: استخدمت في الدراسة الحالية ثلاث عينات من حليب الأغنام، بعد نهاية الحلب مباشرة وذلك من مناطق محيطة بالموصل (بادوش وحماد العليل). أخذت العينات في قناني معقمة سعة ٥٠٠ مل، ونقلت إلى المختبر في صندوق ثلجي لإجراء الاختبارات عليها في مدة لا تزيد عن ٣ ساعات.

المعاملات: ٥٠ مل من عينة الحليب نقلت إلى دورق سعة ١٠٠ مل. غلق الدورق، وادخل إلى فرن المايكروويف من نوع Type:M1877N,Samsung والكوري الصنع. حددت القوة بمقدار ٢,٥ كيلووات، وعوملت العينات بالأشعة لمدة ٦٠ و ٩٠ و ١٢٠ و ١٥٠ و ١٨٠ ثانية، حيث كانت درجة حرارة الحليب بعد المعاملة بالأشعة مباشرة ٧٤ و ٨٦ و ٩٤ و ٩٦ و ٩٨ م°. بردت العينات على درجة حرارة الغرفة ٢٥ م ± ٥ م.

النتق **الديرات الكيميائية والفيزيائية:** تم تقدير النتروجين الكازيني و نتروجين الشرش والنتروجين غير البروتيني بطريقة المايكروكلداهل و حسب الطريقة الموضحة من قبل Ling (١٩٦٣) وذلك بعد الترسيب بالحامض. أما عند قياس زمن التجبن فقد استخدمت الطريقة الموصوفة من قبل Ali (١٩٨٩). أستخدم جهاز pH meter من نوع Beckman pH- meter 7010 في تقدير الاس الهيدروجيني.

المحتوى المايكروبي: يسحب بوساطة ماصة معقمة ١٠ مل من الحليب واضيف إلى ٩٠ مل من محلول ملحي معقم (٩,٠% ملح الطعام) في قنينة معقمة. استخدمت بعد ذلك التخفيفات العشرية المناسبة وذلك لإجراء الفحوصات الآتية:

العدد الكلي للبكتيريا : استخدمت طريقة الأطباق المصبوبة والموضحة من قبل سرحان (١٩٧٩) على وسط
Trypton glucose extract agar (TGEA). حضنت الأطباق على ٣٧°م لمدة ٤٨ ساعة . وحسبت
المستعمرات واستخرج العدد الكلي للبكتيريا .

تاريخ تسلم البحث ٢٠٠٥/٢/١٣ وقبوله ٢٢٣ / ١١ / ٢٠٠٥

مجلة زراعة الرافدين (ISSN 1815-316 X) المجلد (٣٣) العدد (٤)
٢٠٠٥

بكتيريا القولون الذهبية ون: قدر حسب الطريقة المذكورة في APHA (١٩٨٥) باستخدام الوسط الغذائي
MacConky agar وحضنت الأطباق على درجة حرارة ٣٧°م لمدة ٢٤ ساعة . حسبت المستعمرات
ذات اللون الوردي المعتم.

العنقوديات الذهبية : أجري الزرع بطريقة النشر على وسط Manitol salt agar وحسب طريقة (Dillielo, ١٩٨٢) .
حضنت الأطباق على ٣٧°م لمدة ٤٨ ساعة . استخدم الفحص المجهرى وذلك
لعزل العنقوديات الذهبية على اساس الشكل الظاهري ، وتنقى المستعمرات المعزولة على نفس الوسط
بطريقة التخطيط ، وتكرر العملية مرتين على الاقل .

بكتيريا السالمونيلا : استخدم الوسط S.S. agar وحسب مذكره Harrigan و Maccance (١٩٧٦)
وحضنت الدوارق على ٣٧°م لمدة ٢٤ ساعة واختيرت الاطباق التي نمت عليها مستعمرات
بيضاء او وردية . ثم نقل ملئ Loop إلى أطباق بتري حاوية على الوسط Triple sugar iron agar
زرعت بطريقة التخطيط وحضنت على درجة ٢٧°م لمدة ٢٤ ساعة .

قورنت جميع المعاملات مع عينات غير معاملة بأشعة المايكروويف . كررت كل معاملة ثلاثة
مرات . حللت النتائج إحصائياً باستخدام الطرائق المذكورة في Steel و Torri (١٩٦٠) آذ حسبت
قيمة F لمصادر التباين وقورنت بقيمة F الجدولية ، ثم حسب أقل فرق معنوي ووضع تحت مستويات
٠,٠١ و ٠,٠٥ للمقارنة بين المتوسطات .

النتائج والمناقشة

التوزيع النتروجيني : يبين الجدول (١) حدوث زيادة تدريجية في النتروجين الكازيني . كانت النسبة قبل
المعاملة ٠,٥١ % ، وأصبحت بعد المعاملة لمدة ٦٠ و ٩٠ و ١٢٠ و ١٥٠ و ١٨٠ ثانية ٠,٥٣ ، و
٠,٥٤ ، و ٠,٥٨ و ٠,٦١ و ٠,٦٣ % ، على التوالي . أن هذا الارتفاع كان غير معنوي مما يدل على
ثبات الكازين تجاه المعاملة بأشعة المايكروويف . قد يعود السبب الى وجود المجاميع غير القطبية والتي
تحاول الابتعاد عن الوسط المائي واقتربها لمثيلاتها مكونة اواصر فيها طاقة تعطبها صفة الاستقرار ،
وهذا يعتمد على درجة الحرارة حيث انها تضعف على الحرارة المنخفضة ، وتزداد استقرارا على
الحرارة المرتفعة بالاضافة الى التغيرات الطفيفة في الصفات الالكتروفوريئية للكازين (علي
واخرون، ١٩٨٤).

الجدول (١) : تأثير أشعة المايكروويف على النتروجين الكازيني في حليب الأغنام

وقت المعاملة (ثانية)	عدد العينات	المدى %	المعدل \pm الخطأ التجريبي	معامل الانحراف %
قبل المعاملة	٣	٠,٥٥-٠,٤٨	٠,٥١ \pm ٠,١٣	١٤,٦٥
٦٠	٣	٠,٥٨-٠,٤٩	٠,٥٣ \pm ٠,٠٠٧	٦,٢٥
٩٠	٣	٠,٥٩-٠,٥٠	٠,٥٤ \pm ٠,٠١٠	٦٨,٢٦
١٢٠	٣	٠,٦٤-٠,٥٤	٠,٥٨ \pm ٠,٠١٢	٧٢,٠٨
١٥٠	٣	٠,٦٦-٠,٥٧	٠,٦١ \pm ٠,٠٢٣	٧٨,٩٦
١٨٠	٣	٠,٦٨-٠,٥٩	٠,٦٣ \pm ٠,٠٤٢	٨٦,٦٥

أقل فرق معنوي للنتروجين الكازيني ٠,٠٤٤ وان قيمة F المحسوبة ٤,٠٦٥

أما تأثير الأشعة على نتروجين الشرش فان الجدول (٢) يشير إلى وجود نقصا معنويا في نسبة نتروجين الشرش بسبب المعاملة بالأشعة مقارنة بالنسبة قبل المعاملة، حيث كانت ٠,١٨% وأصبحت بعد مدة ٦٠ و ٩٠ ثانية من التعرض لأشعة المايكروويف ٠,١٦ و ٠,١٢%، على التوالي. وعند المعاملة بالأشعة لمدة ١٢٠ و ١٥٠ و ١٨٠ ثانية حدث انخفاض واضحا حيث أصبحت النسبة ٠,١٢ و ٠,١١ و ٠,١٠%، على التوالي. أن السبب قد يعود إلى تثبيط الإنزيمات المحللة للبروتين، كنتيجة للحرارة المتولدة عند التعرض للأشعة، بالإضافة الى حدوث دنثرة لهذه البروتينات، وخصوصا عند التعرض للأشعة لمدة ٩٠ ثانية، والتي تؤدي الى رفع حرارة الحليب الى درجة حرارة اكثر من ٨٦ م° أن النتائج الموضحة في الجدول (٣) تبين وجود زيادة معنوية في نسبة النتروجين غير البروتيني كنتيجة لمعاملة الحليب بالأشعة، حيث أصبحت النسبة ٠,٠٤٥ و ٠,٠٥٣%.

المجلد (٣٣) العدد (٤)

(ISSN 1815-316 X)

مجلة زراعة الرافدين

٢٠٠٥

الجدول(٢): تأثير أشعة المايكروويف على نسبة نتروجين الشرش في حليب الأغنام.

وقت المعاملة (ثانية)	عدد العينات	المدى %	المعدل \pm الخطأ التجريبي	معامل الانحراف %
قبل المعاملة	٣	٠,١٧-٠,١٩	٠,١٨ \pm ٠,٠١	١٣,٣٤
٦٠	٣	٠,١٥-٠,١٨	٠,١٦ \pm ٠,٠٤٣	١٢,٦٧
٩٠	٣	٠,١٢-٠,١٤	٠,١٢ \pm ٠,٠٥٦	١٣,٧٦
١٢٠	٣	٠,١١-٠,١٣	٠,١٢ \pm ٠,٠٤٨	١٢,٤٦
١٥٠	٣	٠,١٠-٠,١٢	٠,١١ \pm ٠,٠٧٦	١٣,٧٢
١٨٠	٣	٠,٠٨-٠,١٢	٠,١٠ \pm ٠,٠٦٤	١٣,٦٣

أقل فرق معنوي بين المعاملات ٠,٠٧٧ وان قيمة F الجدولية ١٢٠,٩٨**

** معنوي عند مستوى ٠,٠١.

إن السبب في هذا التفاوت في الارتفاع مقارنة بوقت التعرض للأشعة قد يعود إلى تأثير الحرارة المتولدة من الأشعة حيث كانت درجة الحرارة ٧٤ و ٨٦ و ٩٤ و ٩٦ و ٩٨ م° عند معاملة الحليب بالأشعة لمدة ٦٠ و ٩٠ و ١٢٠ و ١٥٠ و ١٨٠ ثانية، على التوالي. أن هذه التغيرات ليست باتجاه واحد بسبب حدوث ترسيب لبروتينات الشرش على درجة حرارة اكثر من ٧٦ م°، والتي تحدث عند التعرض للأشعة لمدة ١٢٠ ثانية، مما يؤدي الى قلة تكون النتروجين غير البروتيني بعد هذه المعاملة، (علي واخرون، ١٩٨٤).

الجدول (٣): تأثير المعاملة بأشعة المايكروويف على نسبة النتروجين غير البروتيني لحليب

الأغنام

وقت المعاملة (ثانية)	عدد العينات	المدى %	المعدل \pm الخطأ التجريبي	معامل الانحراف %
قبل المعاملة	٣	٠,٠٣٨-٠,٠٤٢	٠,٠٤ \pm ٠,٠٧٦	٤,٨٤
٦٠	٣	٠,٠٤٤-٠,٠٤٧	٠,٠٤٥ \pm ٠,٠٨٢	٤,٧١
٩٠	٣	٠,٠٥١-٠,٠٥٦	٠,٠٥٣ \pm ٠,٠٦٥	٥,١٣
١٢٠	٣	٠,٠٤١-٠,٠٤٦	٠,٠٤٣ \pm ٠,٠٧٣	٤,٦٥
١٥٠	٣	٠,٠٤٠-٠,٠٤٤	٠,٠٤٢ \pm ٠,٠٦٣	٥,٣٥
١٨٠	٣	٠,٠٤٠-٠,٠٤٢	٠,٠٤١ \pm ٠,٠٥٣	٤,٦٩

أقل فرق معنوي بين المعاملات ٠,٦٣١ وان قيمة F الجدولية ١٢٣,٠٤٥**

** معنوي عند مستوى ٠,٠١.

الصفات الفيزيائية : من خلال جدول (٤) يتبين حدوث زيادة في زمن التجبن بالمنفحة لحليب الأغنام المعامل بالأشعة. أن هذه الزيادة كانت معنوية عند مستوى ٠,٠١ . كانت مدة التجبن للحليب قبل المعاملة ٥ دقيقة و ٢٣ ثانية وأصبحت بعد المعاملة بأشعة المايكروويف لمدة ١٥٠ ثانية ١٦ دقيقة و ١١ ثانية، إلا انه لم يحدث تجبن عند المعاملة بالأشعة لمدة ١٨٠ ثانية. قد يعود السبب الى حدوث تحول للكالسيوم الى الحالة الغروية بسبب ارتفاع الحرارة الناتجة من التعرض للأشعة. بالإضافة الى حدوث ارتفاع في قيم الاس الهيدروجيني والتي تؤدي الى تاخر تجبن الحليب. كما ان حدوث التفاعل بين البيتا لكتوكلوبولين والكابا كازين الناتج من ارتفاع درجة الحرارة يزيد من ثباتية البروتين وتزداد مدة التجبن .

يتضح من الجدول (٥) حصول ارتفاع غير معنوي في الاس الهيدروجيني. فقد حصل ارتفاعا غير معنوي، حيث كان الاس الهيدروجيني قبل المعاملة ٦,٦٤ وأصبح بعد المعاملة بالأشعة لمدة ٦٠ و ٩٠ و ١٢٠ و ١٥٠ و ١٨٠ ثانية ٦,٦٥ و ٦,٦٧ و ٦,٧٢ و ٦,٧٥ و ٦,٧٨، على التوالي . أن هذا الارتفاع قد يعود إلى تأثير حرارة الأشعة على المحتوى المايكروبي وخصوصا البكتيريا المنتجة للحامض. بالإضافة الى تأثير دنتره بروتينات الشرش (Mahran, ١٩٩٠) :

العدد الكلي للبكتيريا: يوضح الجدول (٦) حدوث نقص معنوي في أعداد البكتيريا بعد المعاملة بالأشعة لمدة ٦٠ و ٩٠ و ١٢٠ و ١٥٠ و ١٨٠ ثانية، حيث أصبح العدد 10×31 و 10×21 و 10×7 و 10×3 و 10×6 خلية/مل،

المجلد (٣٣) العدد (٤)

(ISSN 1815-316 X)

مجلة زراعة الرافدين

٢٠٠٥

الجدول (٤): تأثير أشعة المايكروويف على وقت التجبن بالمنفحة لحليب الأغنام

وقت المعاملة(ثانية)	عدد العينات	المدى % ث - د - ث	المعدل \pm الخطأ التجريبي ث د
قبل المعاملة	٣	١٨ - ٥ - ٢٦	٢٣ \pm ٥,٠٦
٦٠	٣	٣٨ - ٥ - ٤٦	٤١ \pm ٥,٣٢
٩٠	٣	٥٦ - ٦ - ٠١	٥٨ \pm ٦,٥٤
١٢٠	٣	١٦ - ٧ - ٥٦	٣٦ \pm ٧,٧٢
١٥٠	٣	١١ - ١٥ - ١٤	١١ \pm ١٦,٥٤
١٨٠	٣	لم يحدث تجبن	لم يحدث تجبن

أقل فرق معنوي بين المعاملات ٨ دقيقة ٣٦ ثانية قيمة F الجدولية ٤٥,١٤
ث = ثانية د = دقيقة

الجدول (٥): تأثير أشعة المايكروويف على الاس الهيدروجيني لحليب الأغنام

وقت المعاملة(ثانية)	عدد العينات	المدى %	المعدل \pm الخطأ التجريبي
قبل المعاملة	٣	٦,٦٣ - ٦,٦٥	٦,٦٤ \pm ٠,٠٤
٦٠	٣	٦,٦٥ - ٦,٦٥	٦,٦٥ \pm ٠,٠٦
٩٠	٣	٦,٦٥ - ٦,٦٨	٦,٦٧ \pm ٠,٠٦
١٢٠	٣	٦,٧٠ - ٦,٧٣	٦,٧٢ \pm ٠,٠٧
١٥٠	٣	٦,٧٣ - ٦,٧٦	٦,٧٥ \pm ٠,٠٩
١٨٠	٣	٦,٧٨ - ٦,٧٨	٦,٧٨ \pm ٠,٠٩

أقل فرق معنوي بين المعاملات ٠,٤١٤ وان قيمة الجدولية ١٣,٨٥

على التوالي بعد أن كان قبل المعاملة 10×30 (هذا يدل على ان الحليب ذو حمولة مايكروبية عالية وقد يعود السبب الى تلوث اوعية الحلب) . أن هذا الاختزال في أعداد البكتيريا كان معنويا عند مستوى

٠,٠١. أن السبب في هذا الانخفاض قد يعود إلى تأثير الحرارة المتولدة من الأشعة على الخلايا المايكروبية وتحطيمها وهذا يتفق مع ما وجدته El-shibiny وآخرون (١٩٨٢) .
بكتيريا القولون : من الجدول نفسه يلاحظ حدوث انخفاض كبير في إعداد بكتيريا القولون بالرغم من إن عينات الحليب كانت محملة بإعداد 10×300 خلية/مل ، وأصبحت بعد المعاملة بالأشعة لمدة ١٥٠ ثانية 10×2 خلية /مل ، في حين لم يلاحظ وجودها عند المعاملة لمدة ١٨٠ ثانية .
البكتيريا العنقودية : الجدول (٥) الموضح لعدد العنقوديات في حليب الأغنام والتي كانت قبل المعاملة 10×4 خلية /مل . عند معاملة الحليب بالأشعة المايكروبية أختفت هذه البكتيريا في جميع المعاملات .
 قد يعود السبب إلى ان مستوى التلوث في العينات منخفض .

جدول (٦) تأثير أشعة المايكروويف على المحتوى المايكروبي لحليب الاغنام .

وقت المعاملة/ثانية	العدد الكلي خلية/مل	بكتيريا القولون خلية/مل	البكتيريا العنقودية خلية/مل	السالمونيلا خلية/مل
قبل المعاملة	10×300	10×300	10×4	10×1
٦٠	10×31	10×30	صفر	صفر
٩٠	10×21	10×300	صفر	صفر
١٢٠	10×7	10×30	صفر	صفر
١٥٠	10×3	10×2	صفر	صفر
١٨٠	10×6	صفر	صفر	صفر

أقل فرق معنوي بين المعاملات ١,١٤٦ وان قيمة الجدولية ٢١,٣٢ للعدد الكلي للبكتيريا
 = = = = =
 = = = = =
 = = = = =
 = = = = =

المجلد (٣٣) العدد (٤)

(ISSN 1815-316 X)

مجلة زراعة الرافدين

٢٠٠٥

بكتيريا السالمونيلا : لم يتوصل في هذه الدراسة إلى وجود بكتيريا السالمونيلا الا بمقدار 10×1 خلية /مل، بالرغم من زيادة حجم العينة المفحوصة . وهذا قد يرجع إلى إن هذا الجنس من البكتيريا سرعان ما يتراجع أمام أي منافسة يلقاها ، خصوصا أمام بكتيريا حامض اللاكتيك (سرحان، ١٩٧٩) . أن معاملة الحليب بأشعة المايكروويف أدى إلى إعطاء حليبا خاليا من بكتيريا السالمونيلا ، حتى عند المعاملة لمدة ٦٠ ثانية . وللأسف لم نستطيع العثور على دراسات تبين تأثير الأشعة على بكتيريا السالمونيلا والعنقوديات .

من خلال هذه الدراسة يتضح تأثير حرارة الأشعة على بعض مكونات الحليب وماله من تأثير على صعوبة صناعة الجبن وذلك لزيادة مدة التجبن وهشاشة الخثرة المتكونة ، بالإضافة الى دنثرة بروتينات الشرش .

EFFECT OF MICROWAVES ON THE NITROGEN DISTRIBUTION AND SOME PHYSICAL PROPERTIES AND MICROBIAL CONTENT ON SHEEPS MILK

Mowafak M.Ali

Al-Badrany H.S.

Nehan B.

Food Sci. Dept., College of Agric. and Forestry, Mosul Univ., Iraq.

ABSTRACT

Sheep milk was subjected to microwave for 60-180 sec., and analysed for nitrogen distribution , pH and rennet coagulation time. Also analysed for total bacterial count, Co- liform bacteria , Staphylococcus and Salmonella. Heating with microwaves improved the bacteriological quality of milk ,but resulted in partial denaturation of

whey proteins ,and Increased the ratio of casein nitrogen and non protein nitrogen,and retardation of the rennet coagulation time of milk.

المصادر

سرحان ، حسن رحيم (١٩٧٩) . بعض البكتيريا المهمة في التسمم الغذائي في الحليب وبعض منتجاته . رسالة ماجستير -قسم الصناعات الغذائية- جامعة السليمانية – العراق .

علي،عامر محمد و الشبيبي ، محسن و العمر ، محمود عيد و طعمة ، صادق جواد (١٩٨٤).كيمياء الالبان . مطابع جامعة الموصل، مديرية مطبعة الجامعة.

Ali , M.M.(1989). Studies on the detailed composition and properties of some constituents of buffalos milk , Ph.D. Thesis.Ain shams Univ.

PHA (1985). American Public Health Association “Standard Methods for the examination of Dairy products 15 th. Ed.NewYork.

Dilliello, R.(1982). Methods in foods and dairy microbiology . AVI.Bub . Inc . westport connecticot 49-74 .

El-shibiny , S.,M.M.Sabour,H.A.El-Alamy and S.Alam (1982).Effect of microwave on Buffalos milk.Egyption J.Dairy Sci. 10 (1)29-34.

Goldblith,A.(1966).Basic principles of microwavs and recent development.Food Res. .15:277-301.

Harrigan, W.andM.Maccance (1976). Laboratory methods in microbiology. Academic press.London

Ling , B.R.(1963).Chemistry Vol.II Chapman and Hall Ltd.A Textbook, London

Lita ,L.(1991). Health effect of microwave radiation (The hidden hazards of microw-cooking.) hmt. Microsoft internet explorer.

Mahran,M.A.(1990).Characterization of soft-surface mould ripened cheese made in Algeria “Tassili cheese “ Egyption J.Dairy Sci.1(18):157-171.

Makarchuch;M.J;A.R.Hill and L.F.Szijarto (1991).Accuracy ang repeatability of milk Total solids analysis by microwave moisture oven,Can.Inst.Sci.Tech.J, 24(314) pp.172

Ozurec,D.J.;P.Baptie and P.Rapid (1989).Inexpensive microwave method for total solid Determination influd dairy products .J.Dairy Sci.27(198): 2777.

Steel;G.D.R.and H.J.Torrie(1960).Principle and procedure of statistic McGraw Hill bo- ok Co. Inc.N.Y.London