

Correlação entre métodos cromogênicos e o método convencional na enumeração de coliformes e *Escherichia coli* em carne bovina moída.

Correlation between rapid and standard methods for counting coliforms and *Escherichia coli* in bovine raw minced meat

RIALA6/1140

Sabrina N. CASAROTTI¹, Aline T. PAULA², Daise A. ROSSI^{3*}

*Endereço para correspondência: ³Faculdade de Medicina Veterinária - FAMEV/LABIO - Universidade Federal de Uberlândia. Av. Ceará, s/n - Bl 2D, sala 43 -, Umuarama, 38405-303 Uberlândia, MG/Brasil
e-mail: daiser@umuarama.ufu.br

¹Universidade Estadual Paulista, Campus de São José do Rio Preto, SP/Brasil.

²Ciências Biológicas - Universidade Federal de Uberlândia, MG/Brasil.

Recebido: 31/07/2007 – Aceito para publicação: 02/01/2008

RESUMO

Os métodos rápidos de análise microbiológica de alimentos apresentam vantagens sobre os ensaios convencionais no que se refere à simplificação do trabalho no laboratório e à redução de tempo na obtenção de resultados. O objetivo deste estudo foi de comparar os testes rápidos Petrifilm® EC e Compact dry® EC e CF com a técnica de análise convencional realizada em placas na enumeração de coliformes totais e coliformes termotolerantes em amostras de carne moída bovina e avaliar as metodologias alternativas para quantificação de *Escherichia coli* nas temperaturas de 35°C e 45°C. A análise de regressão linear dos dados mostrou alta correlação entre as contagens de coliformes totais e coliformes termotolerantes ($R^2 > 0,9$). A correlação entre as contagens de *Escherichia coli* em Petrifilm® e Compact dry® foi também positiva e significativa ($R^2 > 0,9$). Todavia, quando foi feita a comparação entre os resultados da enumeração de *E. coli* a temperaturas de 35°C e 45°C, houve decréscimo no coeficiente de correlação em ambos os sistemas ($R^2 < 0,9$). Considerando-se que os métodos rápidos e a metodologia convencional para contagem de coliformes mostraram-se equivalentes, os resultados sugerem a aplicabilidade dos sistemas Petrifilm® e Compact dry® como técnicas alternativas ao método convencional de plaqueamento.

Palavras-chave. coliformes, Petrifilm®, Compact dry®, método tradicional.

ABSTRACT

Rapid techniques for microbiological analysis of foods show advantages when compared with the conventional methods, as the former are easy-to-performer and no time-consuming assays in getting the results. The aim of this study was to compare the performance of the rapid techniques Petrifilm® EC and Compact dry® EC and CF with the standard method for counting the coliform group in bovine raw minced meat samples. The performances of rapid tests were compared for quantifying *Escherichia coli* at 35°C and 45°C. Simple regression analysis of data showed a strong correlation between Petrifilm® and Compact dry® for determining the number of coliforms, as well as for quantifying *E. coli*. However, when the results of *E. coli* counting at 35°C and 45°C by means of the same technique were compared, the correlation factors were lower. This analysis suggests that rapid techniques are suitable to be employed as alternative techniques for microorganisms counting in raw minced meat.

Key words. coliforms, Petrifilm®, Compact dry®, standard method.

INTRODUÇÃO

A carne e seus produtos derivados apresentam uma alta suscetibilidade às contaminações microbianas, que podem resultar na redução de suas propriedades nutritivas e alterações organolépticas (cor, odor, sabor e textura). Além disso, dependendo da natureza da contaminação, o consumo desse alimento pode resultar em risco à saúde¹.

Os coliformes são os bioindicadores mais utilizados para verificar as condições higiênico-sanitárias de alimentos². Sua presença é considerada uma evidência de práticas de higiene inadequadas para obter os padrões requeridos para o processamento de alimentos³. Os coliformes dividem-se em dois grupos, os coliformes totais e os coliformes fecais ou termotolerantes⁴.

A pesquisa de *Escherichia coli*, espécie pertencente ao grupo dos coliformes termotolerantes, fornece com maior segurança, informações sobre as condições higiênicas dos alimentos e melhor indicação de eventual presença de enteropatógenos. Isso porque a *E. coli* existe exclusivamente no trato gastrointestinal de homens e animais, sendo, portanto, utilizado como microrganismo indicador de contaminação fecal⁵.

Os métodos de plaqueamento em ágar para enumeração de bactérias têm sido tradicionalmente utilizados na avaliação microbiológica da qualidade de alimentos, no entanto, técnicas alternativas têm sido desenvolvidas, buscando-se rapidez e simplicidade, sem comprometimento da sensibilidade e exatidão⁶. Entre as novas tecnologias desenvolvidas para enumeração de microrganismos como alternativas aos métodos convencionais de plaqueamento estão os sistemas Petrifilm® e Compact dry®, que apresentam simplicidade na manipulação e maior rapidez na enumeração⁴.

O Petrifilm® consiste em um sistema pronto para uso contendo meio de cultura desidratado e enzimas cromogênicas em um cartão coberto com filme plástico⁷. O sistema Compact dry® contém meio de cultura com inibidores de enzimas cromogênicas incorporadas, que são capazes de detectar atividades dos microrganismos pesquisados⁴. Ambos contêm agentes solidificantes em água fria.

Para que sejam inseridos como rotina e não representem prejuízos na qualidade dos resultados produzidos, os novos métodos devem ser submetidos e aprovados por órgãos internacionais de certificação como a A.O.A.C. (Association Official Analytical Chemists)⁸.

Para o uso no Brasil em análises de produtos de origem animal, os métodos necessitam ainda, da aprovação do Ministério da Agricultura. A Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003 regulamenta sobre as técnicas de análise que devem ser utilizadas nas indústrias que produzem alimentos de origem animal⁹.

Validações internacionais e nacionais de métodos de análise podem e devem ser repetidas para verificar se há interferência de variações regionais da microbiota ou da matriz alimentícia nos resultados obtidos. Testes internos por comparação com os métodos tradicionais de análise devem ser realizados, já que muitas vezes, características intrínsecas dos alimentos podem interferir nos resultados.

O presente estudo teve como objetivos avaliar e comparar os teste rápidos Petrifilm® EC e Compact dry® EC e CF com a técnica de análise convencional realizada em placas na enumeração de coliformes totais e coliformes termotolerantes em amostras de carne moída bovina e avaliar as metodologias alternativas para quantificação de *Escherichia coli* nas temperaturas de 35°C e 45°C.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das amostras

As análises comparativas foram realizadas em 20 amostras de carne moída adquiridas aleatoriamente em açougues da cidade de Uberlândia, durante o mês de outubro de 2006. Após a coleta, as amostras foram acondicionadas em caixa de isopor contendo gelo e transportadas imediatamente para o Laboratório de Biotecnologia Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (LABIO/FAMEV/UFU), onde foram analisadas.

Preparo das amostras

No laboratório, as amostras receberam um número de identificação e a embalagem foi higienizada externamente com álcool etílico 70% e levadas para fluxo laminar onde foram abertas asépticamente. Pesou-se 25g da amostra em um frasco contendo 225mL da água peptonada 0,1% estéril (AP), e esta foi considerada a diluição 10⁻¹. O conteúdo do frasco foi homogeneizado manualmente e ficou em repouso por 5 minutos e, a partir desta, preparou-se diluições decimais seriadas em 9mL de AP.

Contagem de coliformes totais e termotolerantes pelo método tradicional

Foi utilizada a contagem em placas no agar VRBA com posterior confirmação, que é a metodologia recomendada pelo Ministério da Agricultura na Instrução 62 para amostras em que o limite máximo tolerado é 100 UFC.g⁻¹ ou mL⁻¹ ⁹.

Contagem de coliformes totais e termotolerantes em Petrifilm®

Aliquotas de 1,0mL de cada uma das diluições (10⁻² e 10⁻³) foram transferidas ao centro de placas Petrifilm® EC (3M Company, St. Paul, MN, EUA). Em seguida, utilizou-se o difusor sobre o filme superior, pressionando com cuidado de forma a distribuir o inóculo uniformemente pela área circular. Uma placa foi incubada a 35°C por 48 horas, para detecção de coliformes totais e a outra, a 45°C por 48 horas, para enumeração de coliformes termotolerantes.

Após o período de incubação a presença de coliformes foi determinada pela produção de colônias vermelhas associadas à bolhas de gás. A presença de *Escherichia coli* foi confirmada pela produção de um precipitado azul em torno da colônia associada à bolha de gás. O resultado foi expresso

como UFC.g⁻¹ de *E. coli*. As colônias vermelhas e azuis com bolhas foram somadas e multiplicou-se o resultado pela recíproca da diluição utilizada. O resultado foi expresso como UFC.g⁻¹ de coliformes totais, para as placas incubadas a 35°C, ou como UFC.g⁻¹ de coliformes termotolerantes, para as placas incubadas a 45°C.

Contagem de coliformes totais e termotolerantes em Compact dry® EC e CF

As placas de Compact dry® EC (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan) para contagem de coliformes e *E. coli* e de Compact dry® CF (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan) para contagem somente de coliformes foram inoculadas em duplicata com 1mL das diluições selecionadas (10⁻² e 10⁻³). Uma série de placas de EC e de CF foi incubada a 35°C por 24 horas e a outra (EC e CF) a 45°C por 24 horas.

Foram contadas nas placas de EC, incubadas a 35°C, as colônias azuis, e após a multiplicação pela recíproca da diluição utilizada, o resultado foi expresso como UFC.g⁻¹ de *E. coli*. Nesta mesma placa, as colônias vermelhas ou cor-de-rosa foram contadas e somadas às colônias azuis e após multiplicação pela recíproca da diluição utilizada, o resultado foi expresso como UFC.g⁻¹ de coliformes totais. A contagem nas placas incubadas a 45°C foi feita da mesma forma, porém, a soma das colônias vermelhas e azuis foi expressa como UFC.g⁻¹ de coliformes termotolerantes.

Nas placas CF incubadas a 35°C e 45°C foram contadas as colônias azuis ou verdes. O total de colônias foi multiplicado pela recíproca da diluição utilizada e o resultado foi expresso como UFC.g⁻¹ de coliformes totais ou termotolerantes, respectivamente.

Análise dos resultados

Os diferentes resultados das contagens foram tabulados e transformados em logaritmo de base 10 (log₁₀). Utilizou-se análise de regressão linear e cálculo do coeficiente de correlação (R²) para a comparação dos resultados obtidos nos diferentes métodos.

Na análise estatística foram utilizados os critérios tradicionais de equivalência entre dois métodos que são:

coeficiente angular próximo de 1,0, coeficiente linear próximo de 0,0 e coeficiente de correlação > 0,9¹⁰.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quando os resultados de coliformes totais obtidos foram correlacionados, o coeficiente de correlação (R²) obtido entre Compact dry® EC e método tradicional foi de 0,9567, entre o Compact dry® CF e o tradicional foi de 0,9621, entre Petrifilm® EC e o tradicional foi de 0,9445, entre o Petrifilm® EC e o Compact dry® EC foi de 0,9512, e entre o Petrifilm® EC e o Compact dry® CF foi de 0,9435. A representação gráfica com o coeficiente de correlação e a equação da reta entre os diferentes sistemas pode ser observada nas Figuras 1, 2, 3, 4 e 5.

Os resultados encontrados mostraram coeficiente de correlação superiores a 0,90 em todas as comparações indicando que os sistemas são equivalentes para enumeração de coliformes totais. Além disso, eles foram bem próximos entre si. Os resultados obtidos neste estudo foram semelhantes a outras comparações^{7,11,12} que demonstraram coeficientes de correlação entre 0,95 e 0,96 para Compact dry® EC e CF, respectivamente.

Os índices de correlação entre o Petrifilm® EC e o método tradicional na enumeração de coliformes totais em carne bovina moída obtidos por Beloti et al.¹³ e por Park et al.¹⁴ foram de 0,93 e 0,91, respectivamente, portanto, bastante semelhantes aos obtidos nesse estudo.

No entanto, os valores obtidos nesse estudo são superiores a outras comparações entre Petrifilm® EC e o método tradicional que demonstraram coeficientes de correlação entre 0,83 e 0,86 na enumeração de coliformes totais¹⁵⁻¹⁷.

No presente trabalho a correlação entre os métodos rápidos foi considerada satisfatória. Ferreira¹⁸ comparou as contagens de coliformes totais em cortes de frangos utilizando o Compact dry® EC e o Petrifilm® EC e obteve um coeficiente de correlação R²= 0,9235.

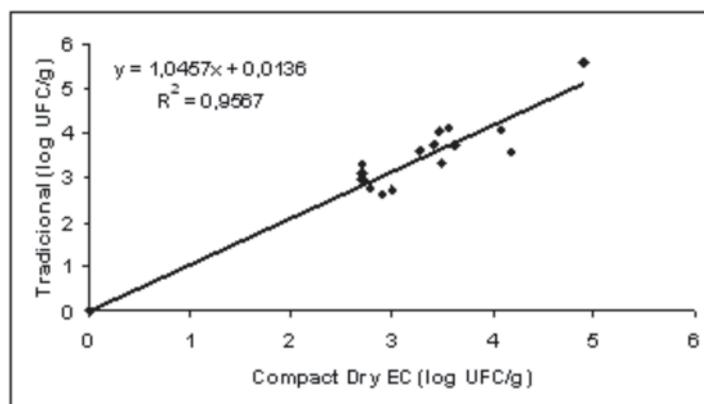


Figura 1. Regressão linear das contagens de coliformes totais obtidas em Compact dry® EC e no método tradicional em 20 amostras de carne bovina moída.

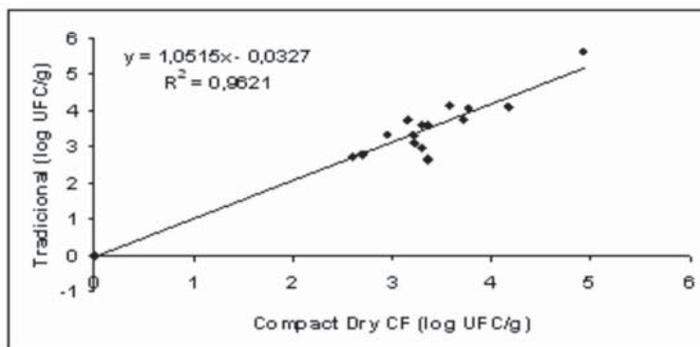


Figura 2. Regressão linear das contagens de coliformes totais obtidas em Compact dry[®] CF e no método tradicional em 20 amostras de carne bovina moída.

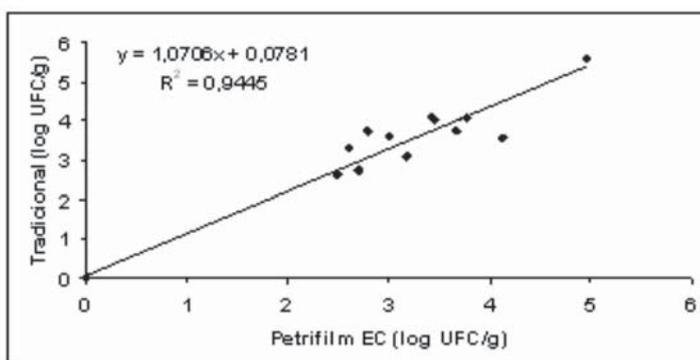


Figura 3. Regressão linear das contagens de coliformes totais obtidas em Petrifilm[®] EC e no método tradicional em 17 amostras de carne bovina moída.

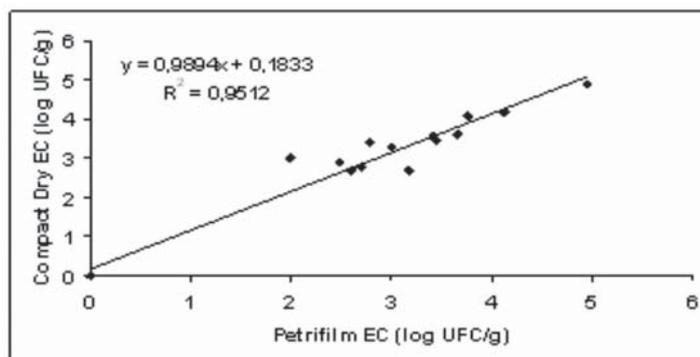


Figura 4. Regressão linear das contagens de coliformes totais obtidas nos sistemas Petrifilm[®] EC e Compact dry[®] EC em 17 amostras de carne bovina moída.

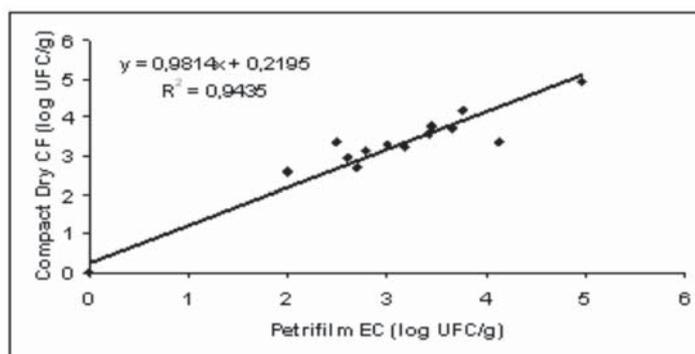


Figura 5. Regressão linear das contagens de coliformes totais obtidas nos sistemas Petrifilm[®] EC e Compact dry[®] CF em 17 amostras de carne bovina moída.

Os métodos rápidos foram desenvolvidos para a incubação a 35°C para a enumeração de coliformes totais e *E. coli*^{19,20}. Ainda não foram desenvolvidas placas específicas dos sistemas Petrifilm® e Compact dry® para a determinação de coliformes fecais, mas é necessário dispor de uma metodologia rápida para detectá-los já que diferentes legislações descrevem padrões para esses microrganismos²¹. Quando Compact dry® EC e CF e o Petrifilm® EC foram incubados a esta temperatura para verificar sua adequação para enumeração de coliformes termotolerantes, os coeficientes de correlação obtidos

foram considerados satisfatórios ($R^2 > 0,9$) quando comparados entre si e à metodologia tradicional. Porém os coeficientes foram ligeiramente inferiores aos observados nas correlações para enumeração de coliformes totais e *E. coli*.

O coeficiente de correlação obtido para contagem de coliformes termotolerantes entre Compact dry® EC e tradicional foi de 0,9137, entre o Compact dry® CF e o tradicional foi de 0,9141, entre Petrifilm® EC e o tradicional foi de 0,9539, entre o Petrifilm® EC e o Compact dry® EC foi de 0,9123, e entre o Petrifilm® EC e o Compact dry® CF foi de 0,9242 (Figuras 6, 7, 8, 9 e 10).

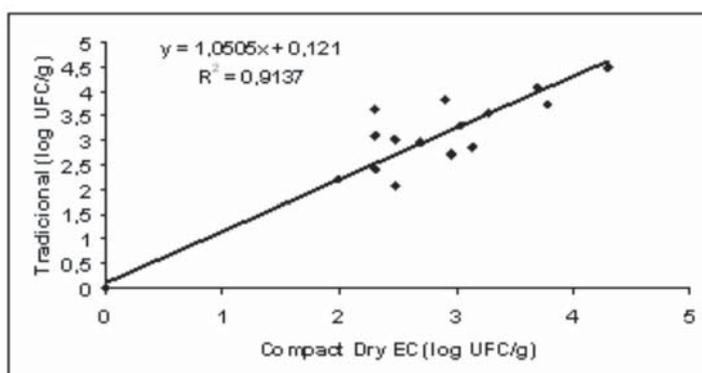


Figura 6. Regressão linear das contagens de coliformes termotolerantes obtidas em Compact dry® EC e no método tradicional em 20 amostras de carne bovina moída

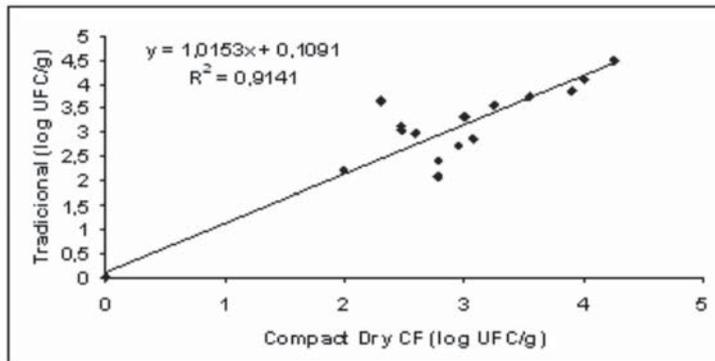


Figura 7. Regressão linear das contagens de coliformes termotolerantes obtidas em Compact dry® CF e no método tradicional em 20 amostras de carne bovina moída.

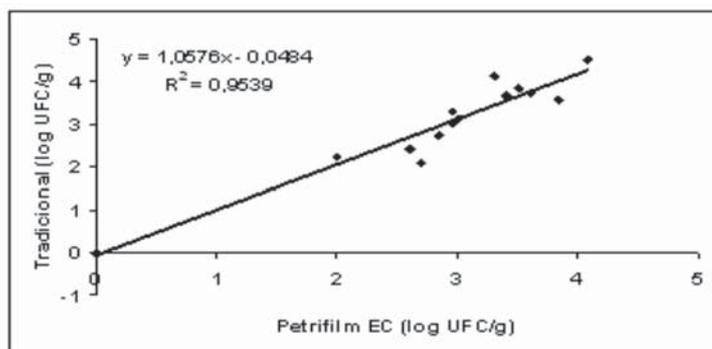


Figura 8. Regressão linear das contagens de coliformes termotolerantes obtidas em Petrifilm® EC e no método tradicional em 17 amostras de carne bovina moída

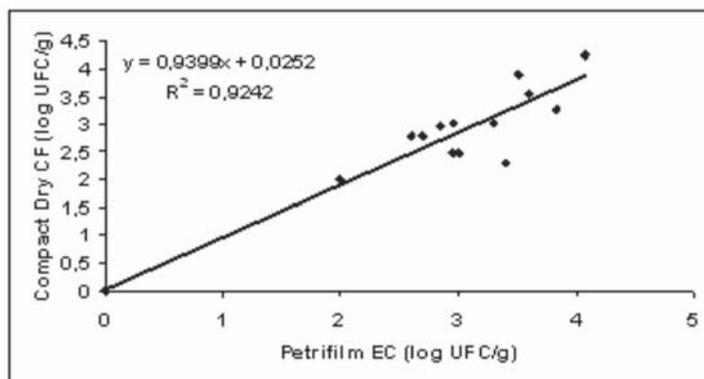


Figura 9. Regressão linear das contagens de coliformes termotolerantes obtidas nos sistemas Petrifilm® EC e Compact dry® EC em 17 amostras de carne bovina moída.

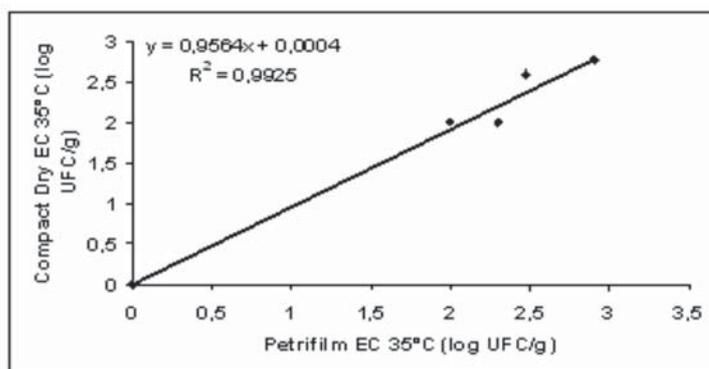


Figura 10. Regressão linear das contagens de coliformes termotolerantes obtidas nos sistemas Petrifilm® EC e Compact dry® CF em 17 amostras de carne bovina moída.

Porém, o coeficiente de correlação para a análise de coliformes termotolerantes obtidos entre Petrifilm® e o método tradicional foi maior do que o encontrado por Blackburn et al.²², que encontraram coeficientes que variaram de 0,85 a 0,93 ao comparar essas metodologias na enumeração de coliformes termotolerantes em uma grande variedade de alimentos. Em outros estudos os coeficientes de correlação encontrados entre o Petrifilm® e o método tradicional na enumeração de coliformes termotolerantes também foram positivos e significativos^{23, 24}.

Os sistemas Petrifilm® EC e Compact dry® EC foram comparados entre si para a enumeração de *E. coli* após incubação nas temperaturas de 35°C, recomendada pelos fabricantes e 45°C. Neste estudo a enumeração de *E. coli* não foi realizada pelo método tradicional.

O índice de correlação entre Petrifilm® EC e Compact dry® EC a 35°C foi de 0,9925 e a 45°C foi de 0,9887 (Figuras 11 e 12). Os índices obtidos indicam que os sistemas são equivalentes para contagem de *E. coli* em ambas as temperaturas. Porém, quando foram realizadas comparações para contagem de *E. coli* entre

Compact dry® a 35°C e 45°C e entre Petrifilm® EC a 35°C e 45°C foi observado decréscimo nos índices de correlação calculados em 0,8041 e 0,7184, respectivamente (Figuras 13 e 14). A diminuição dos coeficientes mostra que existe diferença nas contagens de *E. coli* de acordo com a temperatura de incubação. Em ambos os sistemas as contagens de *E. coli* foram menores quando as placas foram incubadas a 45°C.

Os resultados obtidos indicam que os métodos rápidos analisados podem ser utilizados para a contagem de *E. coli*, desde que a incubação seja realizada à 35°C. Os resultados das contagens de *E. coli* obtidos a 45°C devem ser ignorados, devendo a diferenciação das colônias, somente ser considerada em placas incubadas a 35°C. Isso pode ser comprovado quando se compara os resultados de contagens de amostras em duplicata incubadas a 35°C e 45°C, em que se observa uma diminuição significativa na contagem de *E. coli* ($p < 0,05$) nas placas incubadas a 45°C, quando comparadas com as contagens a 35°C.

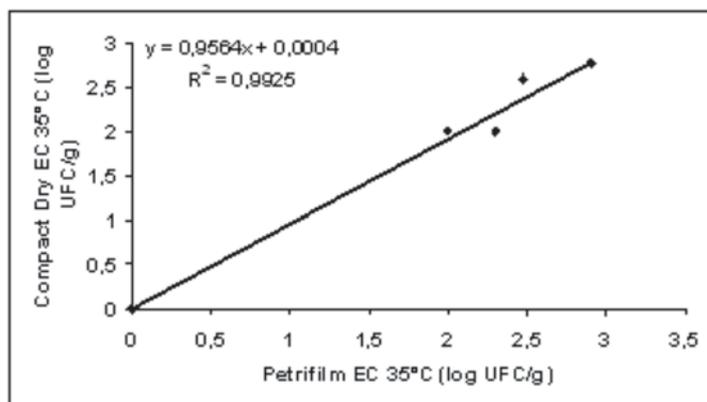


Figura 11. Regressão linear das contagens de *E. coli* obtidas nos sistemas Petrifilm® EC e Compact dry® EC a 35°C em 17 amostras de carne bovina moída.

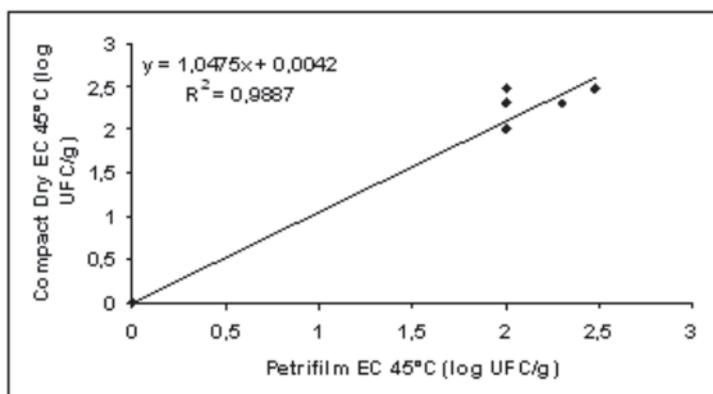


Figura 12. Regressão linear das contagens de *E. coli* obtidas nos sistemas Petrifilm® EC e Compact dry® EC a 45°C em 17 amostras de carne bovina moída.

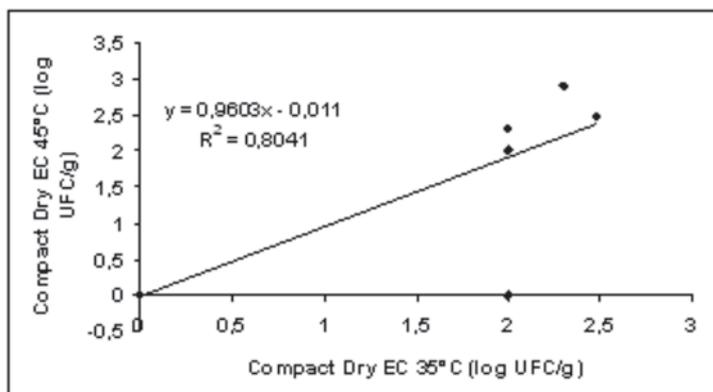


Figura 13. Regressão linear das contagens de *E. coli* obtidas no sistema Compact dry® EC nas diferentes temperaturas de incubação em 17 amostras de carne bovina moída

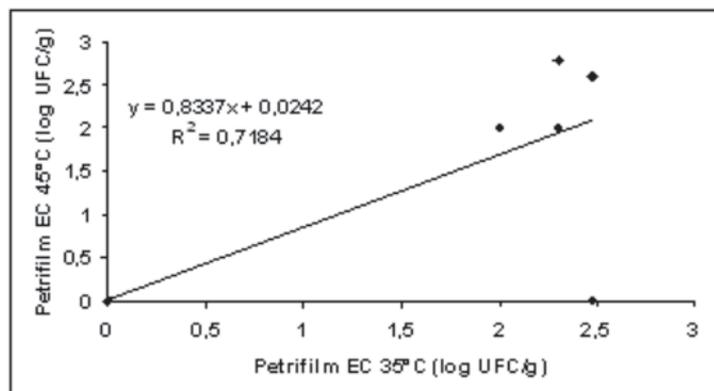


Figura 14. Regressão linear das contagens de *E. coli* obtidas no sistema Petrifilm® EC nas diferentes temperaturas de incubação em 17 amostras de carne bovina moída.

CONCLUSÃO

As correlações encontradas entre as contagens de coliformes totais e coliformes termotolerantes nos sistemas Compact dry® e Petrifilm® EC e a metodologia tradicional indicam que os resultados obtidos através desses métodos rápidos são equivalentes aos obtidos pelo método de referência.

Os resultados obtidos pelos métodos alternativos Compact dry® EC e Petrifilm® EC foram equivalentes na enumeração de *E. coli*, com coeficiente de correlação $R^2 > 0,9$ nas amostras analisadas.

Considerando a boa correlação entre os resultados das metodologias avaliadas e que o Petrifilm® EC e o Compact dry® são sistemas mais simples e práticos, os mesmos podem ser usados como alternativas viáveis nas análises microbiológicas de carne moída bovina, sem comprometer a confiabilidade e a sensibilidade.

REFERÊNCIAS

1. Silva CA, Sousa CP. Estudo da qualidade sanitária da carne moída comercializada na cidade de João Pessoa, PB. *Hig Aliment*. 2004; 18(121): 90-4.
2. Suwansonthichai S, Rengpipat S. Enumeration of coliforms and *Escherichia coli* in frozen black tiger shrimp *Penaeus monodon* by conventional and rapid methods. *Int J Food Microbiol*. 2003, 81(2): 113-21.
3. Loguercio AP, Aleixo JAG. Microbiology of homemade Minas Frescal cheese. *Ciênc Rural*. 2001; 31: 1063-67.
4. Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. São Paulo (BR): Varela, 1996.
5. Franco BDGM, Landgraf M. Microbiologia dos alimentos. 2ed. São Paulo (BR): Atheneu, 1996.
6. Barancelli GV, Sarkis F, Gallo CR, Oliveira AJ. Avaliação de métodos para enumeração de microrganismos aeróbios mesófilos e coliformes em leite cru. *Hig Aliment*. 2004;18(120): 70-84.
7. Bugno A, Almodovar AAB, Pereira TC, Pinto TJA. Aplicabilidade de Petrifilm® na enumeração de bactérias e fungos em drogas vegetais. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2005; 64(1): 20-4.
8. Kodaka H, Mizuochi S, Teramura H, Nirazuka T, Goins D, Odumeru J. et al. Comparison of the Compact Dry EC with the most probable number method (AOAC Official Method 966.24) for enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria in raw meats. *J AOAC Int*. 2006; 89(1): 100-14.
9. Brasil. Instrução Normativa DAS nº62 de 26 de agosto de 2003 do Ministério da Agricultura. Métodos Analíticos Oficiais para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 26 ago. 2003.
10. Fonseca JS, Martins GA. Curso de Estatística. São Paulo (BR): Atlas, 1993.
11. Mizuochi S, Kamiya H, Kodaka H, Sengoku H, Horigome K. Compact dry for the enumeration of bacteria in food. 1999. In: 99th ASM General Meeting, Chicago. 30pp.
12. Kodaka H, Mizuochi S, Teramura H, Nirazuka T, Goins D, Odumeru J. et al. Comparison of the Compact Dry CF with the most probable number method (AOAC Official Method 966.24) for enumeration of coliform bacteria in raw meats. *J AOAC Int*. 2006; 89(1):115-26.
13. Beloti V, Souza JA, Barros MAF, Nero LA, Mattos MR, Gusmão VV, et al. Evaluation of Petrifilm EC and HS for total coliforms and *Escherichia coli* enumeration in water. *Braz J Microbiol*. 2003;34:301-4.
14. Park YH, Seo KS, Ahn JS, Yoo HS, Kim SP. Evaluation of Petrifilm plate method for the enumeration of aerobic microorganisms and coliforms in retail meat samples. *J Food Prot*. 2001;64(11):1841-3.

15. Carvalho CM, Oliveira AJ, Gallo CR. O sistema petrifilm como alternativa aos métodos tradicionais para contagem total de microrganismos aeróbios e coliformes totais em leite cru refrigerado. *Hig Aliment*. 2002; 16(100):116-26.
16. Restaino L; Lyon HR. Efficacy of Petrifilm for enumeration of coliforms and *Escherichia coli* form frozen raw beef. *J Food Prot*. 1987; 50(12):1017-22.
17. Muratori MCS, Oliveira AL, Ribeiro LP, Costa APR, Fernandes SH, Leite RC. Comparación entre el método estándar sugerido por APHA y los métodos Simplate y Petrifilm, para la identificación del grupo coliforme y de *Escherichia coli* em tilapia (*Oreochromis* sp) procedente de piscicultura de agua dulce. *Rev Argent Microbiol*. 2000;32(1):15-9.
18. Ferreira FC. Comparação de diferentes métodos para isolamento de coliformes totais e *Escherichia coli* em cortes de frango. [Tese de Especialização em Biotecnologia e Qualidade de Alimentos]. Minas Gerais: União Educacional Minas Gerais, 2006. 25pp.
19. 3M Company. 3M™Petrifilm™Plates. Folheto teórico, USA, 2004. 4pp.
20. Nissui Co. Simple and Easy Dry Media for Microbial Count and Detection – Compact Dry “Nissui” TC/CF/EC/SA/VP/YM/SL. Folheto teórico, USA, 2006. 8pp.
21. Ortiz MC, Ríos M. Comparación de los métodos Petrifilm y Número Mas Probable (NMP) para La determinación de coliformes fecales em muestras de queso blanco. *Rev Inst Nac Hig Rafael Rangel* 2006; 37(2):15-8.
22. Blackburn CW, Baylis CL, Pettit SB. Evaluation of Petrifilm methods for enumeration of aerobic flora and coliforms in wide range of foods. *Lett Appl Microbiol*. 1996; 22(2):137-40.
23. Schraft H; Watterworth LA. Enumeration of heterotrophs, fecal coliforms and *Escherichia coli* in water: comparison of 3M Petrifilm plates with standard plating procedures. *J Microbiol Methods*. 2005; 60(3):335-42.
24. Priego R, Medina L, Jordano R. Evaluation of Petrifilm series 2000 as a possible Rapid Method to count coliforms in foods. *J Food Prot*. 2000;63(8):1137-40.