

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CAMPUS SÃO BERNARDO
CENTRO DAS LICENCIATURAS INTERDISCIPLINARES

TEREZA CRISTINA MENDES ARAÚJO

**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA TRATADA E DISTRIBUÍDA PELA
CAEMA NA CIDADE DE SÃO BERNARDO - MA**

São Bernardo - MA

2018



TEREZA CRISTINA MENDES ARAÚJO

**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA TRATADA E DISTRIBUÍDA PELA
CAEMA NA CIDADE DE SÃO BERNARDO - MA**

Monografia apresentada ao Curso de
Licenciatura em Ciências Naturais com Habilitação
em Química da Universidade Federal do Maranhão
para obtenção da graduação em Ciências
Naturais/Química.

Orientador: Prof. Me. André da Silva Freires

São Bernardo - MA

2018

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

Araújo, Tereza Cristina Mendes.

Análise Microbiológica da Água Tratada e Distribuída pela CAEMA na Cidade de São Bernardo - MA / Tereza Cristina Mendes Araújo. - 2018.

40 p.

Orientador(a): André da Silva Freires.

Monografia (Graduação) - Curso de Ciências Naturais - Química, Universidade Federal do Maranhão, São Bernardo - MA, 2018.

1. Análise microbiológica da água. 2. CAEMA. 3. Coliformes. I. Freires, André da Silva. II. Título.

TEREZA CRISTINA MENDES ARAÚJO

**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA TRATADA E DISTRIBUÍDA PELA
CAEMA NA CIDADE DE SÃO BERNARDO - MA**

Monografia apresentada ao Curso de Licenciatura em Ciências Naturais/Química da Universidade Federal do Maranhão – Campus São Bernardo, para obtenção do grau de Licenciado em Ciências Naturais com habilitação em Química.

Orientador: Prof. Me. André da Silva Freires

Aprovado em: / /

BANCA EXAMINADORA

Prof. Me. André da Silva Freires
Mestre em Química Analítica pela UFMA
Universidade Federal do Maranhão – Campus São Bernardo

Prof.^a Ma. Gilvana Nascimento Rodrigues
Mestra em Educação pela UFMA
Universidade Federal do Maranhão – Campus São Bernardo

Prof.^a Dr.^a Louise Lee da Silva Magalhães
Doutora em Ciências pela UNICAMP
Universidade Federal do Maranhão - Campus São Bernardo

Agradeço a Deus pela vida, força e disposição para realizar este trabalho. Aos meus Pais João Júnior e Zélia Silva, a minha irmã Laís Cristina e todos os meus amigos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por ter me honrado com a vida, por ter me guiado nessa caminhada e pelas bênçãos que ele me propôs, pois sem Ele eu não sou nada.

Agradeço aos meus pais João Júnior Sardinha e Zélia Silva, por estarem sempre ao meu lado, me incentivando, me apoiando e jamais me deixaram desistir de lutar pelos meus sonhos. Vocês são minha fortaleza, minha razão de vida. Eu amo muito vocês!

Agradeço a minha irmã Laís Cristina, que sempre me apoiou, torceu por mim e contribuiu de forma indireta para a realização deste trabalho.

Agradeço ao meu esposo Frank Sousa, pelo amor, carinho, incentivo e por compartilhar comigo esse momento. Foi muito paciente em minhas ausências e me ajudou me dando apoio moral para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço ao meu amigo e companheiro de todas as horas Longuistayne Rocha, pela paciência, dedicação, pois apesar de seus compromissos ele se dispôs a me ajudar sempre que eu precisasse para a realização deste trabalho, foi meu ombro direito, foi mais que amigo, foi um irmão. Sempre se preocupou e não me deixou desistir jamais.

Agradeço também a toda minha família, por estarem sempre orando por mim, por sempre estarem ao meu lado e por todo apoio e carinho que recebo.

Agradeço ao meu orientador prof. Me. André Freires, pela orientação, paciência, compreensão, dedicação e pela contribuição na realização deste trabalho.

Agradeço aos meus colegas de turma, em especial os amigos Wane Paiva, Vinícius Machado, Ismael Alves, Mônica de Nazaré, Mariane Sousa, Jefferson Santos Francisco Soares Júnior, Gracyelle Zeidam e Pâmella Thaís por estarem sempre comigo, pela ajuda, pelo carinho, por estarmos sempre juntos e nos apoiando nessa longa caminhada.

À todo o corpo docente da Universidade Federal do Maranhão – campus São Bernardo, em especial a Prof.^a Dr.^a Lorena Carvalho Martiniano de Azevedo, Prof.^a Dr.^a Djavania Azevêdo da Luz, Prof.^a Dr.^a Vilma Bragas de Oliveira, Prof.^a Dr.^a Maria do Socorro Evangelista, Prof. Me. Josberg Silva Rodrigues, Prof.^a Ma. Gilvana

do Nascimento Rodrigues, coordenação Prof. Dr. Leonardo Dominici Cruz, a coordenadora de estágio Prof.^a Dr.^a Fernanda Fernandes, pela dedicação e empenho em seus ensinamentos.

Enfim, agradeço a todos que participaram de forma direta e indireta na realização deste trabalho.

Busquem, pois, em primeiro lugar o Reino de Deus e a sua justiça, e todas essas coisas serão acrescentadas a vocês.

(Mateus 6:33)

RESUMO

A água doce é um recurso finito e indispensável à manutenção da vida na Terra e vem sendo, atualmente, alvo de discussões sobre a poluição, escassez e suas formas de uso. É um dos elementos mais importante da biosfera, para a sobrevivência da espécie humana, bem como de toda a vida na Terra. O fornecimento de água com os padrões de potabilidade tornou-se uma questão de saúde pública no final do século XIX e início do século XX, devido à compreensão entre a relação da água contaminada e a proliferação de algumas doenças. O rio Buriti fica localizado a leste do Maranhão, no qual abastece o município de São Bernardo. o presente trabalho teve como objetivo analisar a água do rio Buriti distribuído pela Companhia de Saneamento Ambiental do Maranhão – CAEMA, no município de São Bernardo – MA afim de determinar sua potabilidade e a presença e/ou ausência de coliformes totais e *Escherichia coli*. Os métodos utilizados foram o método de tubos múltiplos e Colilert (enzimático). Foram analisadas uma amostra para cada local (próximo e distante da CAEMA). Os resultados obtidos acusaram ausência tanto de coliformes totais como de *Escherichia coli* para as amostras de água. Concluiu-se que ambas as amostras encontraram-se dentro dos padrões estabelecidos pela legislação vigente, evidenciando que o processo de cloração realizado pela CAEMA, está garantido a potabilidade da água.

Palavras-chave: Análise microbiológica da água; coliformes; CAEMA

ABSTRACT

Freshwater is a finite and indispensable resource for the maintenance of life on Earth and is currently the subject of discussions about pollution, scarcity and its use. It is one of the most important elements of the biosphere, for the survival of the human species, as well as of all life on Earth. The provision of drinking water has become a public health issue in the late nineteenth and early twentieth centuries because of the understanding between the relationship of contaminated water and the spread of some diseases. The river Buriti is located east of Maranhão, where it supplies the municipality of São Bernardo. the present work had the objective of analyzing the Buriti river water distributed by the Environmental Sanitation Company of Maranhão - CAEMA, in the city of São Bernardo - MA to determine its potability and the presence and / or absence of total coliforms and *Escherichia coli*. The methods used were the multiple tube method and Colilert (enzymatic). A sample was analyzed for each site (near and far from CAEMA). The results obtained showed the absence of both total coliforms and *Escherichia coli* for the water samples. It was concluded that both samples were within the standards established by current legislation, evidencing that the chlorination process carried out by CAEMA, is guaranteed the potability of water.

Keywords: Microbiological analysis of water; coliforms; CAEMA

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição da água doce do planeta.....	18
Figura 2 – Curso do rio Buriti - Mapa e Satélite.....	19
Figura 3 – Citobacter, Enterobacter e Klebsiella, respectivamente.....	25
Figura 4 – Bactéria Escherichia coli.....	26
Figura 5 – Amostras de água para análise.....	28
Figura 6 – Procedimento de teste de coliformes totais e <i>E. coli</i> – método de tubos múltiplos.....	31
Figura 7 – Procedimento de teste de coliformes totais e <i>E. coli</i> – método Colilert....	32
Figura 8 – Resultados do teste presuntivo do método de tubos múltiplos.....	34
Figura 9 – Resultados da coloração dos poços no Quanti-Tray após 24 horas de incubação.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados microbiológicos da amostra de água distante da CAEMA do município de São Bernardo – MA usando o método de tubos múltiplos.....	23
Tabela 2. Resultados microbiológicos da amostra de água próximo da CAEMA do município de São Bernardo – MA usando o método Colilert.....	33
Tabela 3. Normas de potabilidade segundo a portaria 2914 do Ministério da Saúde.....	34

LISTA DE SIGLAS

CAEMA – Companhia de Saneamento Ambiental do Maranhão

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

NMP – Número Mais Provável

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
2.1 ÁGUA	17
2.2 RIO BURITI	19
2.3 DOENÇAS TRANSMITIDAS PELA ÁGUA	19
2.4 CAEMA	21
2.5 QUALIDADE PADRÃO DA ÁGUA	21
2.6 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA	24
2.6.1 Bactérias do Grupo Coliformes	24
2.6.1 Bactérias Escherichia coli	25
3 OBJETIVOS	27
3.1 GERAL	27
3.2 ESPECÍFICOS	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 COLETA	28
4.2 AMOSTRAGEM	29
4.3 IDENTIFICAÇÃO	30
4.4 MATERIAIS	30
4.5 REAGENTES	30
4.6 MÉTODO DOS TUBOS MÚLTIPLOS (NMP)	30
4.7 MÉTODO COLILERT	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
6 CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
ANEXOS	40

1 INTRODUÇÃO

A água doce é um recurso finito e indispensável à manutenção da vida na Terra e vem sendo, atualmente, alvo de discussões sobre a poluição, escassez e suas formas de uso. É um dos elementos mais importante da biosfera, para a sobrevivência da espécie humana, bem como de toda a vida na Terra.

Dentre os principais empregos da água, o abastecimento público é o uso mais nobre podendo ser considerada potável, ou seja, devem atender aos parâmetros microbiológicos, físicos, químicos e radioativos estabelecidos pela legislação em vigência, não apresentando ameaças à saúde do consumidor.

O fornecimento de água com os padrões de potabilidade tornou-se uma questão de saúde pública no final do século XIX e início do século XX, devido à compreensão entre a relação da água contaminada e a proliferação de algumas doenças.

A maioria das doenças transmitidas ao homem é causada por microrganismos, como bactérias, protozoários e vírus, que podem ser veiculados pelo ar, contato, alimento e água. Segundo Oliveira (2004), a saúde pública requer água potável segura, o que significa que ela deve estar livre de bactérias patogênicas. Entre os patógenos disseminados em fontes de água, os patógenos entéricos (doenças intestinais) são os mais frequentemente encontrados.

O rio Buriti fica localizado a leste do Maranhão, no qual abastece o município de São Bernardo. Sua extensão ultrapassa os limites territoriais do município de São Bernardo, abrangendo, ainda, os municípios de Santa Quitéria do Maranhão, Brejo, Milagres do Maranhão, Santana e Magalhães de Almeida.

Ele é formado por três cursos d'água: o principal com nascente no município de Brejo, outro, que nasce em Santa Quitéria do Maranhão e um terceiro, cuja nascente está localizada numa região entre São Bernardo e Santana do Maranhão (VAZ, 2016).

A deterioração de suas águas vem ocorrendo devido ao desmatamento que ocorre em suas margens, ao despejo de esgotos domésticos, industriais e agrícolas provenientes do município e povoados próximos, comprometendo a qualidade da água do rio e a saúde de seres que dependem dessa água como fonte de sobrevivência (VAZ, 2016).

Devido a relevância do emprego desse parâmetro microbiológico e a possibilidade da avaliação higiênico-sanitária de água, o presente trabalho teve como objetivo analisar a água do rio Buriti distribuído pela Companhia de Saneamento Ambiental do Maranhão – CAEMA, no município de São Bernardo – MA afim de determinar sua potabilidade e a presença e/ou ausência de Coliformes totais e *Escherichia coli*.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 ÁGUA

A água é considerada um recurso natural essencial para a sobrevivência de todas as espécies que habitam a Terra. No organismo humano a água exerce, entre outras funções, manutenção da temperatura, meio para a troca de substâncias e representa cerca de 70% de sua massa corporal. Além disso, é considerada solvente universal e é uma das poucas substâncias que encontramos nos três estados físicos: gasoso, líquido e sólido. É impossível imaginar como seria o nosso dia a dia sem ela (VICTORINO, 2007, p. 16).

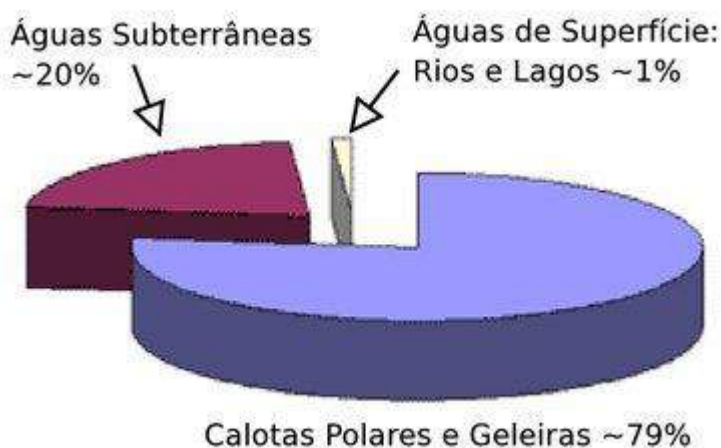
A discussão sobre o uso, consumo e relevância da água é uma pauta abordada globalmente por afetar a todos. Várias discussões em torno do assunto têm sido realizadas, em virtude do maior patrimônio natural do planeta. De suma importância para a sobrevivência, esse bem apresenta-se em risco, por consequência do uso indevido, desperdício e aumento progressivo do seu consumo, assim, deixando as fontes de água doce potável mais suscetíveis a seca. A água pode ser encontrada nos três estados físicos, sendo o mais comum o estado líquido, na atmosfera, nos rios, lagos e oceanos, em lençóis subterrâneos, nas plantas e demais seres vivos

Leoneti et al, (2011) estimaram que a quantidade de água necessária para o desenvolvimento das atividades humanas, tanto no processo de produção de vários tipos de produtos quanto no abastecimento para o consumo de água propriamente dito, vem aumentando significativamente ano após ano no Brasil. Em contraponto, a quantidade de água potável ou de água que possa ser utilizada para satisfazer essas necessidades não aumenta na mesma proporção.

Baseado nas propriedades da água torna-se possível caracterizar os mais variados tipos de vida existentes em nosso planeta. Sendo assim, segundo Siqueira (2011) a água pode ser encontrada na natureza como a água doce, água salgada, água potável, água mineral, água destilada, água termal e a água poluída. Desse modo, a água doce que é encontrada na chuva, nos rios, nos lagos e em lençóis subterrâneos pode apresentar uma quantidade reduzida de sais minerais essenciais à vida, além das geleiras (Figura 1). Na água salgada existe uma grande quantidade de sais dissolvidos, sendo encontrada em mares, oceanos e alguns lagos salgados.

O acesso regular à água potável e segura, embora seja um direito humano básico, não tem sido estendido a toda a população, especialmente àquela encontrada em áreas periurbanas esquecidas pelas políticas públicas de saneamento e saúde. [...] portanto, o abastecimento de água de qualidade e em quantidade suficiente tem importância fundamental para promover condições adequadas à saúde da população e promover o desenvolvimento socioeconômico, principalmente em regiões de vulnerabilidade socioambiental (RAZZOLINI; GUNTHER, 2008, p. 3).

Figura 1. Distribuição da água doce do planeta.



Fonte: Google Imagens.

A água potável deve ser cristalina, ser inodora e não pode conter impurezas. Estes e outros parâmetros são definidos por legislação própria para cada país para que possa ser consumida pelo ser humano. Sendo que a água mineral contém uma quantidade importante de sais minerais que é retirado das camadas do subsolo. De acordo com o tipo de substância dominante na água mineral, ela pode ser classificada de várias maneiras, podendo ser alcalina, ferruginosa, sulfurosa, magnésiana. A água destilada é a água em estado puro, apresenta somente hidrogênio e oxigênio, localizada naturalmente na chuva que não foi exposta a nenhum tipo de poluentes, também pode ser produzida em laboratório (SIQUEIRA, 2011).

A poluição da água é uma situação alarmante pois, já sendo um recurso esgotável, torna-a imprópria para o consumo por conter impurezas. Essas impurezas podem ter origem os esgotos domésticos e industriais, resíduos químicos e lixo

disperso na natureza, causando grandes danos aos recursos hídricos e ao meio ambiente como um todo.

2.2 RIO BURITI

O Rio Buriti é a principal hidrografia do município de São Bernardo -MA, tem sua nascente no povoado Santa Rosa, situada no município de Buriti. O nome Buriti foi dado ao rio pelos Jesuítas Inacianos, em homenagem a cidade que o rio margeava e que foi fundada por eles. Apresenta um curso de aproximadamente de 150 quilômetros de extensão, porém em períodos de chuvas prolongadas, o nível do rio pode alcançar a uma altura de 4 metros acima do seu leito normal. O seu leito é todo forrado com areia branca, a sua água é sempre clara, o banho é uma atração para os filhos da terra e para os que o visitam (VAZ, 2016). O rio tem faz sua desagua no rio Parnaíba, tendo o município de Magalhães de Almeida a cidade mais próxima da foz (Figura 2).

Figura 2. Curso do rio Buriti - Mapa e Satélite.



Fonte: Autora (2018).

2.3 DOENÇAS TRANSMITIDAS PELA ÁGUA

A água que não apresenta parâmetros de potabilidade pode ser uma via transmissora de vários tipos de doenças. A maioria das doenças transmitidas pela água são causadas por microrganismos presentes em reservatórios de água doce,

habitualmente após contaminação dos mesmos por fezes humanas ou de animais. Os descartes oriundos dos mais diversos tipos de atividade humana, têm sido o principal responsável pelas contaminações das águas por agentes infecciosos, podendo ocasionar infecções através do contato com a pele durante o banho, pela ingestão ou pela aspiração de germes presentes na água.

A crescente urbanização e industrialização das cidades têm como consequência um maior comprometimento da qualidade das águas dos rios e reservatórios, devido, principalmente, à maior complexidade de poluentes que estão sendo lançados no meio ambiente e à deficiência do sistema de coleta e tratamento dos esgotos gerados pela população (CETESB, 2013).

Há uma diversidade muito grande de agentes causadores de doenças, podendo ser citado os microrganismos como bactérias, vírus e parasitas, toxinas naturais, produtos químicos, agrotóxicos, metais pesados, entre outros. Ter conhecimentos sobre essas doenças assim como dos sintomas, as formas de infecção e prevenção são de extrema importância para que seja possível desenvolver medidas e ações que possam reduzir suas ocorrências.

Á água é essencial para a existência e bem-estar do ser humano, devendo ser disponível em quantidade suficiente e de boa qualidade como garantia da manutenção da vida. (FREITAS, et al., 2002).

De acordo com Vranjac (2009), dentre as diversas doenças ocasionadas relacionadas à ingestão de água contaminada as principais são: cólera, febre tifoide, hepatite A e doenças diarreicas agudas de várias etiologias: bactérias - Shigella, Escherichia coli; vírus – Rotavírus, Norovírus e Poliovírus (poliomielite – já erradicada no Brasil); e parasitas – Ameba, Giárdia, Cryptosporidium, Cyclospora. Algumas dessas doenças possuem alto potencial de disseminação, com transmissão de pessoa para pessoa (via fecal-oral), aumentando assim sua propagação na comunidade. Outra via de contaminação que pode ser destacada é por meio do consumo de alimentos que foram contaminados devido à falta de higiene ao lavar as mãos ou lavar os próprios alimentos antes do consumo.

2.4 CAEMA

A Companhia de Saneamento Ambiental do Maranhão– CAEMA, é uma sociedade por ações, em regime de economia mista, com capital autorizado, constituída em conformidade com o disposto na Lei Estadual nº 2.653, de 06 de junho de 1966 e ainda a Lei nº 3886, de 03 de outubro de 1967. São objetivos sociais da Companhia, a promoção de saneamento no Estado do Maranhão, em especial a exploração dos serviços públicos de abastecimento de água e esgotos sanitários.

A CAEMA tem como missão promover a saúde e o saneamento ambiental, através do abastecimento de água e do esgotamento sanitário, com responsabilidade social e sustentabilidade, buscando a satisfação dos consumidores. Os trabalhos prestados pela mesma, são relacionados à serviços de manutenção de redes de encanação. E, também, atendimento ao público, impressões de faturas e cobrança administrativa. (PORTAL CAEMA, 2011)

A maior parte da distribuição da água do município de São Bernardo – MA é feita através da CAEMA, e a outra parte é abastecida através de poços. A CAEMA capta a água do Rio Buriti, de onde vem a maior parte do abastecimento do município de São Bernardo – MA.

2.5 QUALIDADE PADRÃO DA ÁGUA

A análise da água de um manancial pode confirmar o uso inadequado do solo, os efeitos do lançamento de efluentes, suas limitações de uso e seu potencial de autodepuração (ALMEIDA et al., 2006), isto é, sua capacidade de restabelecer o equilíbrio após o recebimento de efluentes (VON SPERLING, 2005). Os parâmetros existentes utilizados para o uso de qualificação da água são os físico-químicos (pH, dureza total, cloretos, alcalinidade e sólidos totais) e os microbiológicos (coliformes termotolerantes e totais).

A qualidade da água é determinada por sua composição física, química e bacteriológica. Para consumo humano tem-se a necessidade de água pura e saudável, ou seja, livre de matéria suspensa visível, odor, cor, gosto, organismos capazes de provocar doenças e de quaisquer substâncias orgânicas ou inorgânicas

que possam produzir efeitos fisiológicos prejudiciais à saúde. (RICHTER; NETTO, 1991, p. 25).

As águas superficiais naturais de lagos e rios, quando destinadas ao abastecimento público e para que possam ser utilizadas para o consumo humano, devem reunir certos requisitos físicos, químicos e microbiológicos, enquadrando-se assim no conceito de água potável (DAVID et al., 1999).

As características físicas, químicas e biológicas das águas naturais decorrem de uma série de processos que ocorrem no corpo hídrico e na bacia hidrográfica, como consequência das capacidades de dissolução de uma ampla gama de substâncias e de transporte pelo escoamento superficial e subterrâneo (LIBÂNIO, 2005).

A qualidade da água potável pode sofrer várias mudanças durante o seu trajeto, nos sistemas de distribuição, havendo a possibilidade de alterações das propriedades da água que chega ao consumidor, em relação a sua saída da estação de tratamento. Tais mudanças podem ser provocadas por alterações químicas, microbiológicas ou por uma perda de integridade do sistema (FREITAS et al., 2001).

As características da água são identificadas através dos parâmetros microbiológicos, para verificar se a água está adequada para o consumo. A portaria do Ministério da Saúde nº 5 de 28/09/2017, determina os “procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade” (BRASIL, 2011).

Para destinar a água ao consumo é necessário que seja potável, atendendo os padrões recomendados de potabilidade. Conforme a portaria vigente (Tabela 01), que determina os padrões da qualidade de água, a mesma não pode conter bactérias do grupo coliformes, sendo recomendada a ausência em 100 m l (BRASIL, 2011).

Tabela 1. Normas de potabilidade segundo a portaria nº 5/2017 do Ministério da Saúde.

Tipo de água		Parâmetro		VMP ¹
Água para consumo humano		Escherichia coli ²		Ausência em 100 ml
Água tratada	Na saída do tratamento	Coliformes totais ³		Ausência em 100 ml
	No sistema de distribuição (reservatórios e rede)	Escherichia coli		Ausência em 100 ml
		Coliformes totais ⁴	Sistemas ou soluções alternativas coletivas que abastecem menos de 20.000 habitantes.	Apenas uma amostra, entre as amostras examinadas no mês, poderá apresentar resultado positivo
			Sistemas ou soluções alternativas coletivas que abastecem a partir de 20.000 habitantes.	Ausência em 100 ml em 95% das amostras examinadas no mês.

1 - Valor Máximo Permitido.

2 - Indicador de contaminação fecal.

3 - Indicador de eficiência de tratamento.

4 - Indicador de integridade do sistema de distribuição (reservatório e rede).

Fonte: Ministério da Saúde (2011).

É cada vez maior o número de cidades que apresentam quadros preocupantes quanto à infraestrutura de saneamento básico, devido aos grandes problemas econômicos e estruturais. Esse fato resulta no aumento do número de casos de doenças parasitárias e infecciosas, e consequente elevação dos gastos com a Saúde Pública (DAVID et al., 1999; D'AGUILA et al., 2000).

A Portaria Nº 5 de 28 de setembro de 2017 do Ministério da Saúde é a responsável por fiscalizar, monitorar e controlar a qualidade da água, assim como os agentes encarregados pelos sistemas de abastecimento, análises e distribuição de água.

2.6 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

A análise microbiológica da água é conduzida para investigar a presença ou a ausência de microrganismos neste produto, para quantificar os microrganismos presentes e para identificar e caracterizar as diferentes espécies microbianas. Inúmeros métodos laboratoriais de análise podem ser utilizados em cada uma dessas determinações.

2.6.1 Bactérias do Grupo Coliformes

Os agentes patógenos mais frequentemente encontrados em águas são os coliformes totais ou termotolerantes que são as bactérias do grupo coliformes. Os coliformes totais são grupos de bactérias gram-negativas, que podem ou não necessitar de oxigênio, ou seja, elas podem ser aeróbicas ou anaeróbicas, formam esporos e são associadas à decomposição de matéria orgânica em geral. Apresentam característica geral, a capacidade de fermentar a lactose, com produção de gás a uma dada temperatura (SOUZA et al., 1983).

O grupo coliforme compreende todos os Bacilos Gram negativos, aeróbicos facultativos, oxidase negativos, não esporulados e, que pelo processo de fermentação da lactose, produzem gás a 37° C em um período máximo de 48h. O grupo coliforme compreende vários gêneros, como, por exemplo, *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella* (Figura 3).

Estudos sobre coliformes presentes na água constitui uma das melhores formas de se avaliar a potabilidade ou o grau de poluição desta. Os coliformes veiculados pela água são responsáveis por inúmeros casos de diarreia. Assim, sua detecção e identificação na água assumem relevante papel dentro do contexto da Saúde Pública (HENNRICH,2010).

Gêneros como *Escherichia*, *Klebsiella* e *Enterobacter* são tradicionalmente conhecidos como coliformes, mas o grupo inclui uma diversidade ainda maior, como *Serratia* e *Hafnia*. (WHO, 2006).

Figura 3. Citrobacter, Enterobacter e Klebsiella, respectivamente.



Fonte: Google Imagens.

2.6.1 Bactérias Escherichia coli

A *Escherichia coli* é uma das bactérias Gram-negativas mais comuns causadores da sepse no choque induzido por endotoxina (Figura 4). Sua presença em água e alimentos é um indicador de contaminação fecal (KONEMAN, 2008; TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

E. coli está incluída tanto no grupo de coliformes totais, quanto no dos coliformes termotolerantes. Seu habitat natural é o trato intestinal de animais endotérmicos, embora possa ser introduzida nos alimentos através de fontes não fecais (SILVA et al., 2010).

É um bacilo Gram-negativo, não formador de esporos, anaeróbio facultativo, que fermenta açúcares, com produção de ácidos e gases (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). É a espécie bacteriana mais comum do trato intestinal, assim como a mais comumente isolada em laboratórios clínicos e tem causado doenças infecciosas em praticamente todos os tecidos e sistemas orgânicos dos seres humanos.

Normalmente *E. coli* não é patogênica, contudo pode causar infecções do trato urinário. Certas linhagens produzem enterotoxinas que causam a diarreia do viajante e ocasionalmente causam várias doenças graves de origem alimentar.

A bactéria *E. coli* não causa dano quando está presente na flora intestinal normal do ser humano e animais endotérmicos. Porém, quando encontrada em

outras regiões do corpo, pode causar doenças graves, como infecções do trato urinário, bacteremia e meningite (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2011).

A *E. coli* foi então diferenciada dos Coliformes totais como um indicador mais específico de poluição fecal (LECLERC et al., 2001). Outra diferença da *E. Coli* é a capacidade para a produção da enzima β – glucuronidase (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2011).

Figura 4. Bactéria Escherichia coli.



Fonte: Google Imagens.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Analisar os parâmetros microbiológicos da água provinda do rio Buriti e distribuída pela Companhia de Saneamento Ambiental do Maranhão – CAEMA da cidade de São Bernardo – MA e comparar com a norma estabelecida pela Portaria Nº 5 de 28 de setembro de 2017 do Ministério da Saúde.

3.2 ESPECÍFICOS

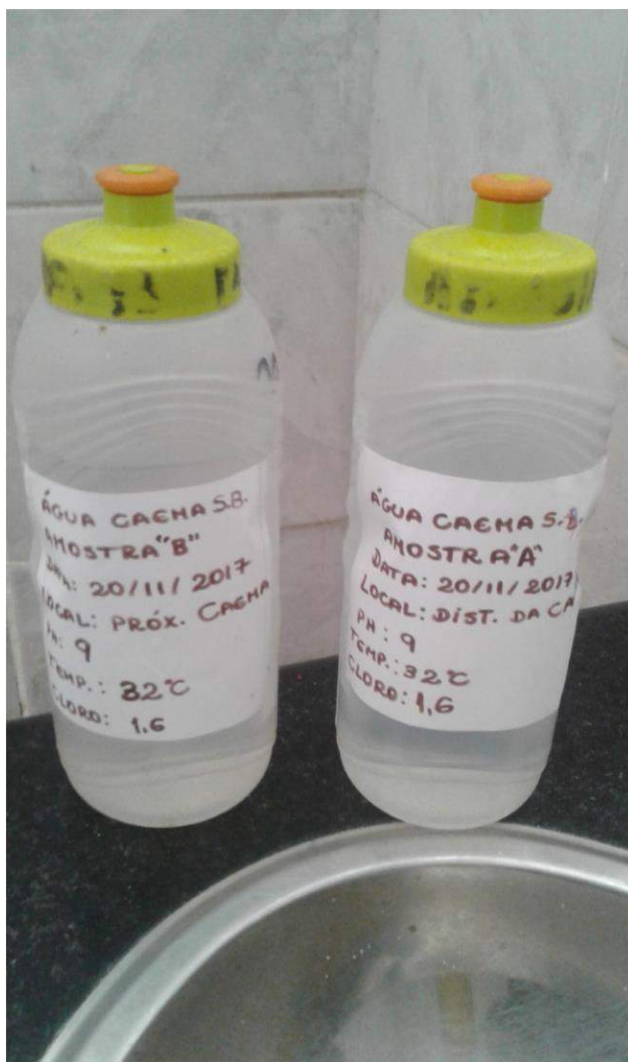
- Verificar se há presença de bactérias do grupo coliformes, especificamente coliformes totais e *Escherichia coli* utilizando o método de Tubos Múltiplos e enzimático Colilert.
- Comparar os dados das análises com a norma padrão vigente para água potável.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA

Para realização desta pesquisa, coletou-se duas amostras de água, em dois pontos distintos, distribuída pela Companhia de Saneamento Ambiental do Maranhão – CAEMA no município de São Bernardo – MA para serem devidamente analisadas (Figura 1).

Figura 5. Amostras de água para análise.



Fonte: Autora (2017).

O primeiro ponto de coleta foi em uma residência com distância aproximada de 2,0 KM da CAEMA, no qual a primeira amostra (A) estava com temperatura 32 °C, às 06:30h, no dia 20 de novembro de 2017.

A segunda amostra (B) foi coletada em uma residência com distância aproximada de 0,1 KM da CAEMA. Coletou-se a amostra às 06:45h com a temperatura da água a 32 °C no dia 20 de novembro de 2017.

Antes de realizar o procedimento de coletas das amostras, realizou-se uma visita aos pontos de coletas para verificar se os mesmos recebiam água diretamente do sistema de distribuição e não de caixas, reservatórios, cisternas, poços etc.

Para a coleta das amostras foram escolhidas torneiras sem filtro, abriu-se a torneira por um período de 3 a 5 minutos, tempo necessário para que as impurezas contidas na encanação pudessem ser eliminadas no descarte de água. A torneira foi aberta a meia secção possibilitando um fluxo pequeno e controlado para que não haja respingos. A tampa do frasco de coleta foi removida seguindo os cuidados de assepsia recomendados, tomando precauções para evitar a contaminação da amostra pelos dedos, luvas ou outros materiais.

O frasco foi colocado verticalmente próximo à base da torneira e efetuou-se o enchimento, deixando um espaço de aproximadamente 2,5 a 5 cm da tampa, para posterior homogeneização da amostra antes de iniciar a análise. Logo após a coleta os frascos foram fechados, fixando-se bem a tampa. Identificou-se adequadamente a amostra no frasco.

As amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo e encaminhadas ao laboratório de microbiologia, no Pavilhão Tecnológico – UFMA, Campus Bacanga na cidade de São Luís – MA e realizou-se as análises no dia 20 de novembro de 2017. O tempo entre a coleta e entrega da amostra no laboratório não excedeu 12 horas.

4.2 AMOSTRAGEM

A coleta das amostras foi realizada conforme recomendações técnicas e com assepsia da legislação vigente para sistemas de abastecimentos (Portaria nº 5/2017 MS), que recomenda um volume mínimo de 100 ml, o qual deve ser coletado em recipientes de vidro neutro ou plástico autoclavável, não tóxico, com capacidade mínima de 125 ml, boca larga e tampa a prova de vazamentos.

4.3 IDENTIFICAÇÃO

Os frascos das amostras foram identificados com as seguintes informações: número da amostra, data da coleta, local, pH, temperatura, cloro residual e outras informações necessárias para que os resultados possam ser interpretados corretamente.

4.4 MATERIAIS

Para a realização do presente estudo foram utilizados os seguintes equipamentos: Estufa bacteriológica a 35°C, tubos de Durham, tubos de ensaio, estante para tubo de ensaio, pipetas esterilizadas (10ml e 1ml), bico de Bunsen, frascos de coleta esterilizados, alça de platina com cabo de Kolle, Quanti-Tray, Seladora (Quanti-Tray Sealer PLUS), Lâmpada de ultravioleta de longo comprimento de onda (366 nm).

4.5 REAGENTES

Caldo Lactosado (CL), Substrato enzimático Colilert.

4.6 MÉTODO DOS TUBOS MÚLTIPLOS (NMP)

Para determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes em uma dada amostra é utilizada a técnica de tubos múltiplos. Que consiste na inoculação de volumes decrescentes da amostra, em meio de cultura adequado ao crescimento dos microrganismos estudados, sendo cada volume inoculado em uma série de tubos.

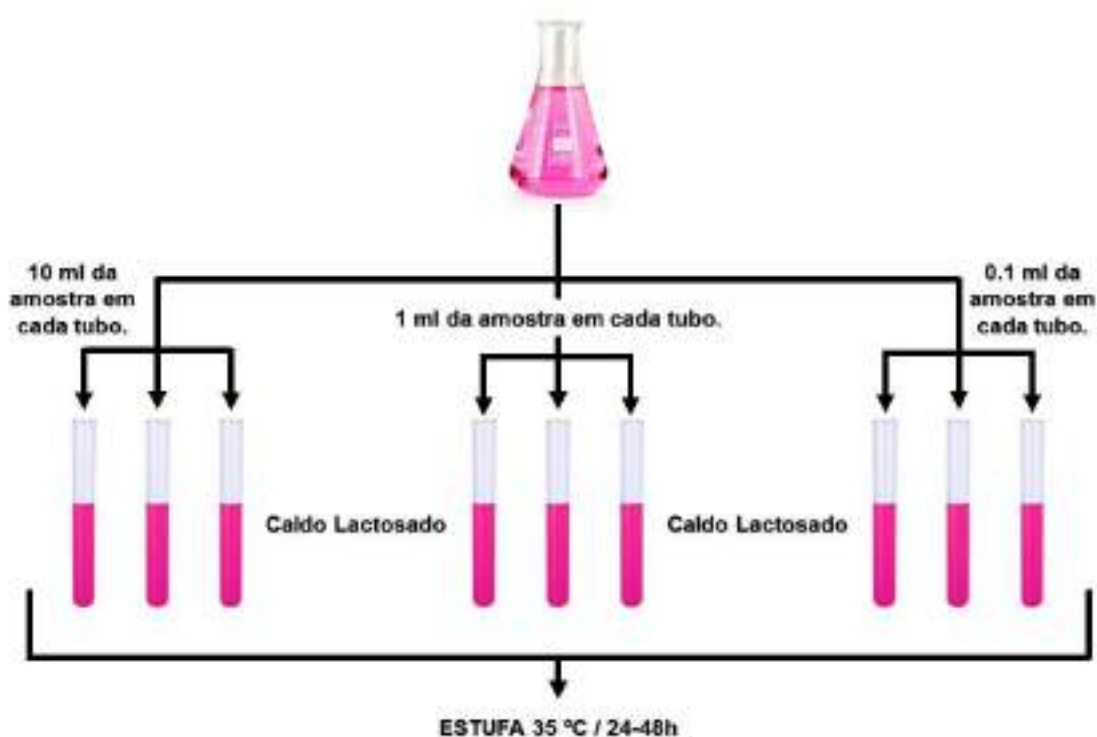
Primeiramente, o teste presuntivo foi realizado afim de detectar a presença de fermentadores de lactose, especialmente do grupo coliforme. Células estressadas por tratamentos térmicos, congelamentos, etc., podem ser recuperadas nessa fase.

Fez-se a semeadura de volumes de 10 ml, 1 ml e 0,1 ml da amostra **A** em séries de tubos (em triplicata), devidamente identificados, contendo Caldo Lactosado

(Figura 2). Incubou-se os tubos inoculados a uma temperatura de $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, durante 48 horas.

Por fim, verificou-se na tabela o NMP - Tabela de Hoskin – (Anexo A), correspondente aos tubos de caldo E.C. positivos para a presença de coliformes fecais e expressou-se o resultado em NMP/100 ml.

Figura 6. Procedimento de teste de coliformes totais e *E. coli* – método de tubos múltiplos.



Fonte: Autora (2017).

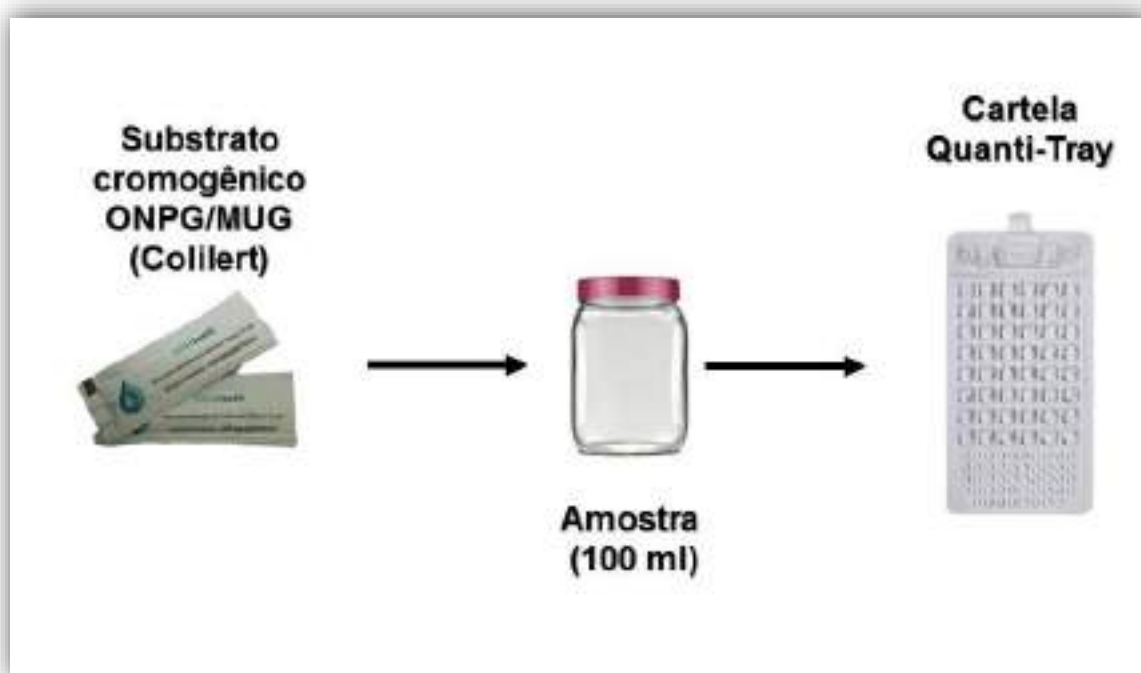
4.7 MÉTODO COLILERT

Consiste em um método rápido e prático para determinação de coliformes totais e *E. coli*, usando substratos definidos. O presente método utiliza substratos hidrolisáveis para a detecção simultânea de enzimas dos coliformes totais e *Escherichia coli*.

Assepticamente, adicionou-se o reagente (substrato enzimático) a 100 ml da amostra de água **B** num frasco de vidro não fluorescente. Misturou-se

completamente para dissolver e vetou-se no Quanti-Tray/2000 (Figura 7) com auxílio de uma seladora específica. Após, vedou-se na seladora o Quanti-Tray e incubou-se a $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 24 horas

Figura 7. Procedimento de teste de coliformes totais e *E. coli* – método Colilert.



Fonte: Autora (2017).

Decorridos às 24 horas de incubação, expôs-se o Quanti-Tray a uma lâmpada de ultravioleta de longo comprimento de onda (366 nm). Contou-se os poços com fluorescência e verificou-se a tabela Quanti-Tray/2000.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A cloração, que consiste na adição de uma solução química de cloro na água, importante etapa do processo de potabilidade, sendo utilizada para prevenir doenças e eliminar parasitas, vírus, fungos e bactérias, é indicada para o tratamento em estações que fornecem água para a população e em indústrias de alimentos e bebidas. Devido ao seu elevado poder biocida e oxidante, ele é capaz de penetrar nas membranas celulares, remover biofilmes e inativar os micro-organismos.

Devido à dificuldade de acesso aos laudos laboratoriais da CAEMA, teste microbiológicos foram realizados com intuito de avaliar a eficiência da cloração na água distribuída no município de São Bernardo - MA.

As tabelas a seguir mostram os resultados obtidos para os parâmetros microbiológicos das análises das amostras de água coletadas em residências (uma próxima e outra distante) da CAEMA no município de São Bernardo – MA.

Tabela 2. Resultados microbiológicos da amostra A (água distante da CAEMA) coletada no município de São Bernardo – MA usando o método de tubos múltiplos.

Análises	Resultados	Padrões
Coliformes Totais / NMP / 100 ml	Ausência	Ausência
Pesquisa de <i>Escherichia coli</i>	Ausência	Ausência

Fonte: Autora (2017).

O método de tubos múltiplos é um método de baixo custo, simples e rápido, variando de 24 a 48 horas para obtenção dos resultados, que são apresentados em Número Mais Provável (NMP) por 100 ml da amostra. Na análise realizada, após a incubação da amostra em caldo Lactosado durante 48 horas, verificou-se que não houve acidificação ou produção de gás nos tubos de Durham (Figura 8), características existentes quando há bactérias do grupo coliformes. Sendo assim, na amostra A, não foi detectada presença de coliformes totais ou *E. coli*.

Tabela 3. Resultados microbiológicos da amostra B (água próximo da CAEMA) coletada no município de São Bernardo – MA usando o método Colilert.

Análises	Resultados	Padrões
Coliformes Totais / NMP / 100 ml	Ausência	Ausência
Pesquisa de <i>Escherichia coli</i>	Ausência	Ausência

Fonte: Autora (2017).

O princípio do método Colilert baseia-se na quantificação de coliformes (totais e fecais) presentes em uma amostra de água, após reação com o reagente Colilert patenteado. Os resultados são obtidos quando há mudança de coloração para amarelo, evidenciando a presença de bactérias do grupo coliformes e fluorescência, evidenciando a presença de *E. coli* quando exposta a luz ultravioleta. Correlaciona-se a quantidade de poços grandes e poços pequenos contaminados, (Figura 9), utilizando uma tabela Quanti-Tray/2000 (Anexo B). Na análise realizada, após 24 horas de incubação, a amostra não apresentou mudança de coloração, permanecendo em cor transparente. Isso comprova que a amostra não possui bactérias do grupo coliforme ou *E. coli*, apresentando boas condições para consumo, estando de acordo com a Portaria nº 5 de 27 de Setembro de 2017 do Ministério da Saúde.

Figura 8. Resultado do teste presuntivo do método de tubos múltiplos



Fonte: Autora (2017).

Figura 9. Resultados da coloração dos poços no Quanti-Tray após 24 horas de incubação.



Fonte: Autora (2017).

A água potável deve estar em conformidade com o padrão microbiológico, sem patógenos e carga mínima de bactérias heterotróficas. Os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e o padrão de potabilidade são conferidas pela Portaria Nº 5 de 28 de Setembro de 2017 do Ministério da Saúde, como apresentado na tabela 3.

Para uma amostra de água “potável” a mesma deverá está de acordo com o padrão microbiológico de potabilidade, onde, é imprescindível a ausência de coliformes totais em 100 ml da amostra na saída do tratamento. Contudo, admite-se a presença de coliformes totais em somente uma amostra mensal para sistemas ou soluções coletivas que abastecem menos de 20.000 habitantes e em 5% das amostras mensais em sistemas ou soluções coletivas que abastecem mais de 20.000 habitantes. Vale salientar que em ambos os casos não é aceito a presença de *Escherichia coli* na água para consumo humano. E as amostras de água analisadas em estudo estavam dentro destes parâmetros de acordo com as tabelas expostas, o que lhes confere confiabilidade ao consumidor.

6 CONCLUSÃO

Os testes da água destinada ao consumo humano são de suma importância, uma vez que permite conferir e avaliar a ausência ou não de microrganismos ou substâncias químicas nela presentes, que podem ser prejudiciais à saúde das pessoas.

Os resultados obtidos para a amostra A, utilizando o método de tubos múltiplos, não detectou a presença de coliformes totais ou *Escherichia coli* em 100 ml de amostra. A amostra B, utilizando o método Colilert, método mais rápido em relação ao da amostra A, também não apresentou presença microbiológica de coliformes totais e *E. coli*. Logo, ambas as amostras encontraram-se dentro dos padrões estabelecidos pela legislação vigente, evidenciando que o processo de cloração realizado pela CAEMA, está garantido a potabilidade da água.

Vale ressaltar que a água distribuída pela CAEMA (Companhia de Saneamento Ambiental do Maranhão), no município de São Bernardo – MA, tem atendido as normas de tratamento e distribuição de água, conferindo aos habitantes água em boas condições para consumo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria MS Nº 5 DE 28/09/2017. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. D.O.: 14/12/2011.

CETESB, Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. **Variáveis de Qualidade das Águas**. Disponível em: Acesso em: 15 de Mar. de 2013.

D'AGUILA, P. S.; ROQUE, O. C. C, MIRANDA, C. A. S., FERREIRA, A. P. Avaliação da qualidade de água para abastecimento público do município de Nova Iguaçu. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.16, p. 791-798, 2000

DAVID, P. R. B. S.; MENDES, A. C. R.; CUNHA NETO, A.; COSTA, S. M. S. Avaliação da qualidade microbiológica de águas minerais e de abastecimento de alguns pontos da cidade do Recife, PE: um relatório de experiência de alunos do mestrado em nutrição da UFPE. **Hig. Alim.**, v. 13, p. 36- 41, 1999.

FREITAS, M. B.; BRILHANTE, O. M.; ALMEIDA, L. M. Importância da análise de água para a saúde pública em duas regiões do estado do Rio de Janeiro: enfoque para coliformes fecais, nitrato e alumínio. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.17, p. 651-660, 2001.

FREITAS, V. P. S.; BRÍGIDO, B. M.; BADOLATO, M. I. C.; ALABURDA, J. **Padrão físico-químico da água de abastecimento público da região de Campinas**. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 61 (1): 51-58, 2002.

HENNRICH, Ivan. Inter-relação entre as políticas públicas e o consumo de água não tratada nas comunidades de Santa Rosa e São Pedro no município de PORTO UNIÃO-SC. 103f. 2010. Dissertação (mestrado) - Universidade do Contestado, Programa de mestrado em desenvolvimento regional, Canoinhas. 2010.

KONEMAN, et al. **Diagnóstico microbiológico**: texto e atlas colorido. Trad. Eiler Fritsch Toros, et al. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

LECLERC, H. et al. Advances in the bacteriology of the coliform group: their suitability as markers of microbial water safety. **Annu. Rev. Microbiol.**, v.55, p.201-234, 2001. Disponível em: <

<http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.micro.55.1.201>>. Acesso em: 15 fev. 2018.

LEONETI, A. B. et al. **Saneamento básico no Brasil**: considerações sobre investimentos e sustentabilidade para o século XXI. Revista de Administração pública, Rio de Janeiro, v. 45, n. 2, mar./abr. 2011.

LIBÂNIO, M. Fundamentos de qualidade e tratamento de água. Campinas: Átomo, 2005.

OLIVEIRA, A.C.S. de; TERRA, A. P. S. Avaliação microbiológica das águas dos bebedouros do Campus I da Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, em relação à presença de coliformes totais e fecais. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 37, n. 3, p. 285-286, 2004.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Diretrizes para a qualidade da água potável. 4. ed. Genebra: WHO, 2011 541 p. Disponível em: . Acesso em: 14 de fev. 2018.

PORTAL CAEMA. **Apresentação CAEMA**. 2011. Disponível em: <http://www.caema.ma.gov.br/portalcaema/index.php?option=com_content&view=article&id=676>. Acesso em 25 de junho de 2018.

RAZZOLINI, Maria Tereza Pepe; GÜNTHER, Wanda Maria Risso. **Impactos na saúde das deficiências de acesso a água**. Saúde soc. vol.17 no.1 São Paulo Jan./Mar. 2008.

RICHTER, C. A. e NETTO, J. M. A. **Tratamento de água: tecnologia atualizada**. São Paulo: Edgard Blucher, 1ª Edição 1991, 6ª reimpressão 2005

SILVA, G. N. F; OLIVEIRA, V. L. de. **Microbiologia**: manual de aulas práticas. Florianópolis: Ed. da UFSC, 2007.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 4ª ed. São Paulo: Editora Varela, 2010

SIQUEIRA, L. A. **Água fonte de vida**. Monografia de Especialização, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Medianeira, 2011.

SOUZA, L. C., IARIA, S. T., PAIM, G. V., & LOPES, C. A. M. **Bactérias coliformes totais e coliformes de origem fecal em águas usadas na dessedentação de animais.** Revista de Saúde Pública, p. 112-122, 1983

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia.** MARTINS, R. M. (trad. atual.). 8ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

Vaz R. N., São Bernardo Documentário História da Matriz de São Bernardo Nossa Terra Nossa Gente. 4ª ed. Sobral Gráfica e Editora, 2016.

VICTORINO, C. J. A. Planeta água morrendo de sede: uma visão analítica na metodologia do uso e abuso dos recursos hídricos. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007.

VON SPERLIG, M. **Introdução a qualidade das águas e tratamento de esgotos.** Belo Horizonte, UFMG/DESA, v.1, 452p. 2005.

VRANJAC, A. **Doenças relacionadas à água ou de transmissão hídrica.** Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DDTHA), Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE), CCD/SES-SP, em dezembro de 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for drinking-water quality.** First addendum to third edition. v. 1. Recommendations. 3. ed. 2006.

ANEXOS

Anexo A. Tabela de Hoskin - NMP com limite de confiança de 95%.

<u>Número de tubos positivos nas diluições</u>				<u>Número de tubos positivos nas diluições</u>			
10 mL	1 mL	0,1 mL	NMP/100mL	10 mL	1 mL	0,1 mL	NMP/100mL
0	0	0	3	2	0	0	9.1
0	1	0	3	2	0	1	14
0	0	2	6	2	0	2	20
0	0	3	9	2	0	3	26
0	1	0	3	2	1	0	15
0	1	1	6.1	2	1	1	20
0	1	2	9.2	2	1	2	27
0	1	3	12	2	1	3	34
0	2	0	6.2	2	2	0	21
0	2	1	9.3	2	2	1	28
0	2	2	12	2	2	2	35
0	2	3	16	2	2	3	42
0	3	0	9.4	2	3	0	29
0	3	1	13	2	3	1	36
0	3	2	16	2	3	2	44
0	3	3	19	2	3	3	53
1	0	0	3.6	3	0	0	23
1	0	1	7.2	3	0	1	39
1	0	2	11	3	0	2	64
1	0	3	15	3	0	3	95
1	1	0	7.3	3	1	0	43
1	1	1	11	3	1	1	75
1	1	2	15	3	1	2	120
1	1	3	19	3	1	3	160
1	2	0	11	3	2	0	93
1	2	1	15	3	2	1	150
1	2	2	20	3	2	2	210
1	2	3	24	3	2	3	290
1	3	0	16	3	3	0	240
1	3	1	20	3	3	1	460
1	3	2	24	3	3	2	1100
1	3	3	29	3	3	3	2400

Fonte: American Public Health Association (APHA, 1992).

Anexo B. Tabela Quanti-Tray/2000

# Large Wells Positive	IDEXX Quanti-Tray®/2000 MPN Table (per 200µl)																																							
	# Small Wells Positive																																							
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34						
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					
1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					
2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					
3	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					
4	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					
5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					
6	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					
7	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					
8	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	27	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	28	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30	0	0	0	0	0	0			
31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	31	0	0	0	0	0	0		
32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	32	0	0	0	0	0	0	
33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33	0	0	0	0	0	0
34	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	34	0	0	0	0	0	0