



UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS – ESPE
CARRERA DE INGENIERIA EN BIOTECNOLOGÍA
Moreno, Silvana



SELECCIÓN DE UN SOPORTE SÓLIDO PARA EL INÓCULO I5-ESPE EN UN BIORREACTOR ANAEROBIO, A NIVEL DE LABORATORIO, DIRIGIDO AL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES TEXTILES

RESUMEN

Se trabajó con tres reactores de vidrio con una capacidad de 7L, en cada uno se colocó el inóculo I5-ESPE y agua sintética, en relación 2:1, para permitir la adaptación de los microorganismos con recirculación cada 24 horas. La selección del soporte se realizó en base a parámetros físicos y químicos. Entre los parámetros físicos se determinó la porosidad, densidad y peso específico de cada material; en cuanto a los parámetros químicos se evaluó la remoción de DQO y color, la cantidad de microorganismos por conteo en placa, SST y SSVL. Se controló la temperatura en un rango de 35°C con un temperatura mínima de 32°C durante la recirculación y el pH entre 6.5 y 7.5.

Se comparó el desempeño de los tres tratamientos mediante estadística paramétrica y se determinó que la cáscara de coco como soporte alcanzó los mejores resultados estadísticamente significativos de remoción de DQO y del color. Adicionalmente, ofrece ventajas como: amplia superficie específica que favorece la adherencia de los microorganismos; bajo peso específico que permite utilizar estructuras de contención sencillas; vida útil prolongada.

Palabras Claves: filtro anaerobio, consorcio microbiano, flujo semicontinuo.

INTRODUCCIÓN

La industria textil se remonta a la época colonial, cuando se empleaba lana de oveja para fabricar tejidos. A inicios del siglo XX se introdujo el algodón y actualmente, la industria textil ecuatoriana fabrica productos provenientes de todo tipo de fibras, entre las más utilizadas están el algodón, poliéster, nylon, acrílicos, lana y seda (AITE, 2012).

La actividad textil se caracteriza por ser altamente contaminante, debido a los residuos que genera y los altos consumos de agua, energía y reactivos químicos. Las aguas residuales generadas dependen de los procesos llevados a cabo, los parámetros más significativos son la DQO, la DBO, los sólidos totales, el AOX, toxicidad, carga orgánica, color, conductividad y, en ocasiones, el nitrógeno. El pH puede ser básico o ácido en función de los colorantes utilizados y, en algunos

casos, puede haber presencia de metales (CAR/PL, 2002).

El agua de la industria textil generalmente mantiene niveles de DBO₅ de alrededor de 1600 mg/L, por lo que puede utilizar diferentes sistemas de tratamiento, entre ellos los reactores anaerobios. Estos reactores son los únicos capaces de deshacer los enlaces AZO que presentan las tintas utilizadas en el teñido. Los valores de pH comunes en la industria textil son ideales para el proceso y las aguas son fácilmente degradables en forma anaerobia a un costo muy bajo, lo que hace a esta tecnología óptima y cada vez más utilizada (IMBRIUM, 2010).

Las bacterias anaerobias necesitan un soporte para desarrollarse, crecen formando una capa alrededor del soporte (biopelícula), con lo que al fluidizar el agua residual a tratar, se eleva el contacto de los microorganismos con el sustrato (Morgan, Revah, & Noyola, 2000).

Los soportes empleados dependen del tipo de reactor. Comúnmente se utilizan soportes de baja densidad como el nylon, poliéster y polietileno, para obtener un menor gasto energético al fluidizar el lecho y disminuir los tiempos de retención hidráulica entre 12-1 horas (Moreno, 2003).

Un aspecto importante para mejorar la eficiencia de las plantas de tratamiento, es escoger un soporte adecuado para el desarrollo y crecimiento de los microorganismos. Se deben considerar características de los soportes como: una gran superficie o

área de contacto por unidad de volumen, el material sólido debe ser económico y de bajo peso específico para que el recipiente que lo contiene pueda ser construido sin que sea necesario emplear materiales de gran resistencia mecánica, por consiguiente, de alto costo (Moreno, 2003).

Entre los materiales de soporte más utilizados se encuentran: piedras, roca volcánica, empaques plásticos de formas diversas, placas en arreglos específicos, madera, plumas, nueces, perlas de vidrio, PVC, alúmina, carbón activado (GAC), arena, entre otros (Moreno, 2003).

MATERIALES Y MÉTODOS

Activación del inóculo I5 del banco de cepas del Laboratorio de Microbiología del CEINCI - ESPE

El consorcio microbiano existente en el banco de cepas del laboratorio de Microbiología del CEINCI/ESPE, inóculo I5, fue activado con el medio de cultivo Jiang (2004) modificado en las investigaciones de Moncayo y Ayala (2010), en la fuente de calcio, magnesio y hierro, utilizando como fuente de carbono glucosa. La composición del medio fue: (NH₄)₂ SO₄, 56g/L; MgSO₄7H₂O, 19,6g/L; NaCl 1,4g/L; CaSO₄ 2H₂O, 1,92g/L; K₂HPO₄, 14g/L; KH₂PO₄, 28g/L; EDTA-Fe 0,03g/L y Glucosa, 70g/L (Moncayo, 2010; Ayala, 2010).

Se esterilizaron las soluciones stock por separado y una vez que estaban a temperatura ambiente se unificaron y se aforó al volumen requerido con agua

estéril a temperatura ambiente (Moncayo, 2010).

Selección del material de los tres soportes

Se seleccionaron tres tipos de soporte y se analizaron sus características para determinar su eficiencia. Se consideró el peso específico del soporte y el área de superficie de contacto por unidad de volumen del medio de soporte (Geocities, 2009).

Se escogió la roca común, un material de bajo costo y baja eficiencia, sin embargo es muy utilizado a nivel industrial (Geocities, 2009).

También se empleó plástico de botellas, ya que posee una alta eficiencia. Debido al bajo peso específico del soporte, se puede construir plantas de tratamiento de grandes volúmenes en superficie relativamente menores, ganando en altura y con materiales más económicos (Geocities, 2009).

El tercer material de soporte fue la cáscara de coco, ya que es un material biológico, considerado como desecho, con bajo peso específico y una porosidad adecuada.

Se esterilizó el material de soporte para evitar la interferencia de microorganismos propios de cada material o del ambiente. Se desinfectó los reactores con alcohol y savlón.

Obtención de un biorreactor a nivel de laboratorio para evaluar la eficiencia de cada soporte

Se trabajó con un biorreactor de vidrio de 7L, en donde se colocó 1,35L de agua sintética y 2,7L de inóculo (Muñoz, 2011). El soporte se afirmó con malla plástica a 3,5cm del fondo y con una altura de 5cm (Ríos, 2006). Se conectaron mangueras de agua y de gas en los orificios, respectivamente.

Estabilización del inóculo I5 en el material de soporte dentro del biorreactor

Se colocó el inóculo y el agua sintética en una relación 2:1 (Muñoz, 2011) y se tomó muestras cada 24 horas para controlar la adaptación de la biomasa dentro del reactor, mediante el análisis de DQO, SST y SSVL, además, se controló que el pH se mantenga entre 6,5 y 7,6 y una temperatura de 35°C (Martí, 2006).

Se trabajó con los reactores en flujo semicontinuo, extrayendo 300 mL de agua tratada y colocando 300 mL de agua sintética cada 24 horas, manteniendo un volumen constante de 4 L.

2.5.6. Evaluación del agua sintética antes y después del tratamiento para establecer comparaciones entre los resultados, mediante el análisis de la DQO, SSVL, SST y color

La evaluación del agua sintética se realizó mediante la medición de parámetros como DQO, SST, SSLV y color; antes y después del tratamiento. Una vez obtenidos los resultados se

observó la evolución del tratamiento y se realizó comparaciones entre los tres soportes.

La demanda química de oxígeno (DQO), se realizó mediante el protocolo planteado por Atiaga (2012). Se preparó una solución digestora de rango alto, un estándar de biftalato de potasio (KHP) y una solución de ácido sulfúrico. Se recogieron las muestras en frascos de cristal, y en caso de ser inevitable el retraso antes del análisis, se conservó la muestra por acidificación a un pH \leq 2 utilizando ácido sulfúrico concentrado (STANDARD METHODS 5-17 DQO, 2002).

Los sólidos suspendidos totales (SST) se determinaron midiendo con una probeta 20 mL de muestra previamente homogeneizada la cual depende de la concentración esperada de sólidos suspendidos. Se filtró la muestra a través del crisol Gooch, se suspendió el vacío y se secó el crisol en la estufa a una temperatura de 103°C a 105°C durante 1 h aproximadamente (Ojeda, 2004).

Los sólidos suspendidos volátiles en el licor mixto (SSLV), se determinaron utilizando el protocolo del “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (2004)”, sin modificaciones. Se tomó 20 mL de cada muestra y se filtró con papel filtro marca WHATMAN de porosidad 0,1 mm, se colocó el papel en estufa a 550 \pm 50°C y se pesó.

El color se determinó por espectrofotometría, diariamente durante treinta días (Moncayo, 2010).

Análisis de datos

El análisis de datos fue realizado en el programa estadístico Infostat. Para el análisis del diseño experimental, se obtuvieron gráficas de perfil, para observar la interacción entre factores y determinar la diferencia entre los tratamientos aplicados. Se realizó un ANOVA, para comprobar la homogeneidad de varianzas ($>0,05$) y se aplicó comparaciones múltiples de medias, con el método de Duncan, con el 0,05 de significancia, con la cual se obtuvieron los grupos de homogeneidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de aspectos físicos de los soportes

Los soportes utilizados son materiales fáciles de conseguir y relativamente económicos.

Porosidad

Se analizó la porosidad de cada material mediante la capacidad de absorción de agua.

Se realizaron cinco repeticiones y se obtuvieron los resultados presentados en la tabla 1, donde se puede observar que el material con mayor porosidad es la cáscara de coco y el de menor porosidad es el plástico.

Tabla 1: Porosidad de los soportes

Material	Porosidad
Roca	44.24%
Plástico	13.96%
Coco	83.06%

Según Pérez, *et al.*, (1997) la estructura de los soportes es un aspecto importante para la colonización de los

microorganismos. La distribución de los poros y su tamaño garantizan una superficie de contacto para la generación de la biopelícula y la transferencia de la masa contaminante, favoreciendo las condiciones adecuadas para la adhesión microbiana desde los estadios iniciales del proceso. En este estudio se analizó la porosidad de los tres materiales de soportes y se obtuvo resultados similares a estudios previos.

Según Sanders (1998), la porosidad de la grava varía entre un 25 y 40%; la porosidad obtenida fue 44.24% para la roca común. Según Torres *et al.* (2003), la porosidad de la cáscara de coco es 83%, el valor obtenido fue 83.06%. La porosidad obtenida para el plástico fue 13.96%.

En la tabla 2, se puede observar el análisis de varianza y el test de Duncan, que indican que los tres soportes tienen una porosidad estadísticamente diferente. El valor p es menor a 0.05, por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula ($H_0 : \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$) y se concluye que la porosidad de cada material es diferente.

El valor de las medias mediante el test de Duncan se presentan en la parte inferior de la figura.

Tabla 2: Análisis de varianza y test de Duncan de la porosidad de los soportes en Infostat.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Porosidad	15	0,99	0,99	5,08

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)						
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo	11997,93	2	5998,96	1048,76	<0,0001	
Material de soporte	11997,93	2	5998,96	1048,76	<0,0001	
Error	68,64	12	5,72			
Total	12066,57	14				

Test:Duncan Alfa=0,05			
Error: 5,7201 gl: 12			
Material de soporte	Medias	n	E.E.
Plástico	13,96	5	1,07 A
Roca	44,24	5	1,07 B
Coco	83,06	5	1,07 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)

La figura 1 presenta la porosidad de cada soporte en porcentaje y se aprecia claramente la diferencia entre los valores, observándose que la cáscara de coco tiene el valor de porosidad más alto.

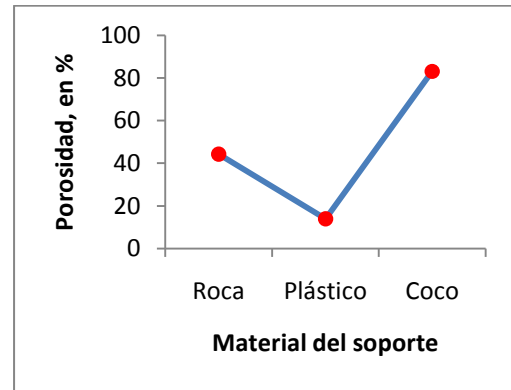


Figura 1: Porosidad de cada soporte en porcentaje.

Densidad y peso específico

Se determinó experimentalmente la densidad de cada soporte, se realizaron cinco repeticiones y con los datos obtenidos se calculó el peso específico. Se obtuvo los resultados presentados en la tabla 3, en donde se puede observar que la cáscara de coco es el material con menor densidad y por ende peso específico; la roca común es el material con mayor densidad y peso específico.

Tabla 3: Densidad y peso específico de los materiales de soporte.

Material	Densidad (g/cm ³)	Peso específico (N/m ³)
Roca común	1.81	17738
Plástico	1.26	12348
Cáscara de coco	1.03	10084

La tabla 4 indica el análisis de varianza y el test de Duncan realizados en Infostat, con lo cual se concluye que los tres soportes tienen una densidad estadísticamente diferente con un valor p menor a 0.05. El valor de las medias

mediante el test de Duncan se encuentran en la parte inferior de la tabla y se observa tres grupos diferentes (A, B, C).

Tabla 4: Análisis de varianza y test de Duncan de la densidad de los soportes en Infostat.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
densidad	15	0,89	0,87	9,52

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1,61	2	0,80	47,49	<0,0001
Material de soporte	1,61	2	0,80	47,49	<0,0001
Error	0,20	12	0,02		
Total	1,81	14			

Test:Duncan Alfa=0,05
 Error: 0,0169 gl: 12
 Material de soporte Medias n E.E.

Material	Medias	n	E.E.
Coco	1,03	5	0,06 A
Plástico	1,26	5	0,06 B
Roca común	1,81	5	0,06 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (pc= 0,05)

El peso específico de los medios de soporte es una característica elemental pues mientras menor sea el peso, el costo de construcción disminuye, ya que no se requiere un refuerzo estructural extremo para los tanques que sostienen el medio filtrante y el transporte e instalación del material se facilita.

Los resultados obtenidos demuestran que la cáscara de coco es el material más liviano, con una densidad de 1.03 g/cm³ y un peso específico de 10.08 kN/m³, seguido de plástico con una densidad de 1.26 g/cm³ y un peso específico de 12.34 kN/m³. La roca común tiene una densidad de 1.81 g/cm³ y un peso específico de 17.73 kN/m³, es el material con el peso específico más alto lo que implica mayores gastos en construcción a gran escala.

Análisis de aspectos químicos de los soportes

Remoción de DQO

La demanda química de oxígeno (DQO) se determinó con el protocolo planteado por Atiaga, 2012.

En la tabla 5 se aprecia el análisis de varianza y el test de Duncan realizados en Infostat. Los valores obtenidos de la demanda química de oxígeno de cada soporte no son estadísticamente diferentes.

Tabla 5: Análisis de varianza y test de Duncan de la demanda química de oxígeno en Infostat.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
DQO 2	93	2,4E-03	0,00	55,11

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	20653,76	2	10326,88	0,11	0,8976
Material	20653,76	2	10326,88	0,11	0,8976
Error	8596814,52	90	95520,16		
Total	8617468,28	92			

Test:Duncan Alfa=0,05
 Error: 95520,1613 gl: 90
 Material Medias n E.E.

Material	Medias	n	E.E.
Coco	545,50	31	55,51 A
Plástico	555,82	31	55,51 A
Roca común	580,98	31	55,51 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (pc= 0,05)

La figura 2 presenta un diagrama de barras de la variación de la demanda química de oxígeno de cada tratamiento y su repetición. Los datos demuestran que el tratamiento con cáscara de coco como soporte presenta los valores más bajos de DQO.

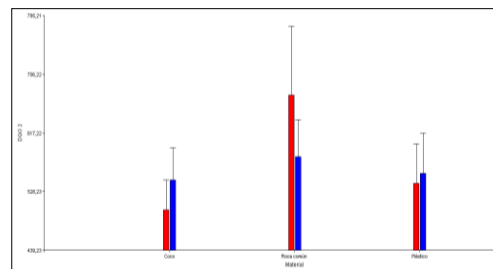


Figura 2: Diagrama de barras de la variación de la demanda química de

oxígeno de cada tratamiento y su repetición en Infostat.

La figura 3 muestra un diagrama de puntos de la variación de la demanda química de oxígeno de cada tratamiento en el tiempo.

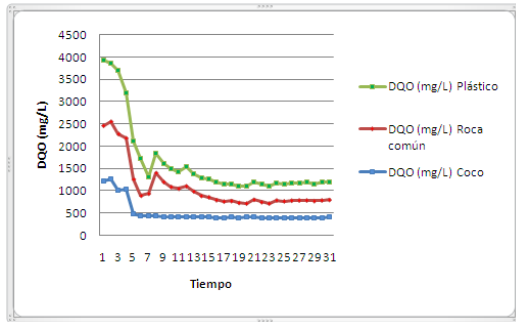


Figura 3: Variación de la demanda química de oxígeno de cada soporte en el tiempo en Excel.

La demanda química de oxígeno es un parámetro utilizado para determinar la actividad del consorcio I5-ESPE.

A pesar de disminuir la DQO en aproximadamente un 50%, no es suficiente para cumplir con la normativa establecida, ya que según la Dirección Metropolitana de Medioambiente (2010), el límite permisible para descargar a la alcantarilla es 240 mg/L, a un cuerpo de agua dulce y marina es 123 mg/L y los niveles obtenidos se encuentran alrededor de 500 mg/L. Por lo que se recomienda utilizar un tratamiento previo al agua residual para obtener mejores resultados.

Remoción de color

La remoción del color se determinó por espectrofotometría mediante la

comparación de la absorbancia de cada muestra. En la tabla 6 se puede observar el análisis de varianza y el test de Duncan de los resultados obtenidos de la remoción de color en cada tratamiento.

Los resultados obtenidos demuestran que el tratamiento con cáscara de coco como material de soporte tiene el porcentaje de remoción más alto siendo 45.92%. Los demás tratamientos presentan valores de remoción similares, para el tratamiento con plástico como soporte, el promedio de remoción de color es 34.98% y para el tratamiento con plástico como soporte es 32.42%.

Tabla 6: Análisis de varianza y test de Duncan de los datos obtenidos en la remoción del color de cada reactor en Infostat.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Remoción de color	2 90	0,20	0,18	31,58

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	3084,75	2	1542,38	10,84	0,0001
Material	3084,75	2	1542,38	10,84	0,0001
Error	12379,75	87	142,30		
Total	15464,50	89			

Test:Duncan Alfa=0,05	
Material	Medias n E.E.
Roca	32,42 30 2,18 A
Plástico	34,98 30 2,18 A
Coco	45,92 30 2,18 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)

La figura 4 es un diagrama de barras de la remoción de color de cada soporte y sus repeticiones. Se destaca el tratamiento con cáscara de coco como soporte al obtener los valores de remoción de color más altos.

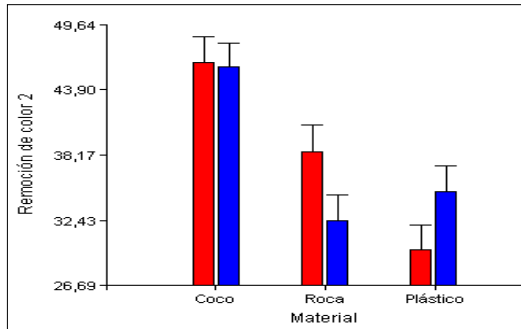


Figura 4: Diagrama de barras de la remoción del color en porcentaje en Infostat.

El color es un parámetro que puede estar asociado con la presencia de compuestos tóxicos y grupos cromóforos o polímeros de alto peso molecular como lignina, sin embargo, pocas veces se considera un contaminante, según Dirección Metropolitana de Medioambiente (2010), el límite de descarga a un cuerpo de agua dulce y agua marina debe ser inapreciable en dilución 1/20, estimando sobre 10 cm de muestra diluida, lo cual se cumplió con el tratamiento realizado

Cantidad de biomasa

La cantidad de biomasa presente en los reactores se determinó por conteo en placa, lo cual se realizó a diario. También se analizó la cantidad de sólidos suspendidos totales y sólidos suspendidos volátiles en el licor mezcla cada tres días.

Control de parámetros

Presencia de microorganismos externos

Los soportes utilizados por su naturaleza tienen una variedad de

microorganismos como bacterias, hongos y levaduras. Para no alterar el consorcio microbiano I5, se intentó eliminar los microorganismos con ebullición, sin embargo no se obtuvo resultados positivos, por lo tanto, se decidió esterilizarlos en el autoclave a 121°C y 15 psi. Los reactores se desinfectaron con alcohol al 70% y savlón.

Temperatura

Se mantuvo a una temperatura constante de 35°C +/- 1. En el momento de la recirculación la temperatura mínima fue de 32°C.

pH

Se tomó el pH de cada reactor diariamente, para controlar que se encuentre en 6,5 y 7,5.

Oxígeno disuelto

El estudio se realizó en condiciones anaerobias, por lo que se controló la presencia de oxígeno con un medidor de oxígeno disuelto portátil. Los valores obtenidos oscilaron entre 0,5 y 2 mg/L en los tres reactores.

CONCLUSIONES

- El inóculo I5- ESPE se estabilizó dentro de los biorreactores controlando el pH, temperatura y mediante conteo en placa durante ocho días, observándose que respondía positivamente al remover el color y la DQO. Durante los siguientes veintidós días se estudió la evolución de los reactores analizando todos los parámetros establecidos en muestras del efluente tomadas cada 24 horas.

color y retención de microorganismos.

- Las características físicas analizadas demuestran que la cáscara de coco es el material con mayor porosidad (valor $p = 0.0001$), menor densidad (valor $p = 0.0001$) y menor peso específico (valor $p = 0.0001$), presentando los mejores resultados estadísticamente significativos.
- La cáscara de coco como soporte permitió alcanzar los mejores resultados de remoción de color y DQO, sin embargo no se cumple con el límite establecido en la normativa del Distrito Metropolitano de Quito para la DQO que es 240 mg/L para descargas al alcantarillado. Adicionalmente, ofrece ventajas como: amplia superficie específica que favorece la adherencia de los microorganismos, bajo peso específico que permite utilizar estructuras de contención sencillas y vida útil prolongada.
- El soporte con la mayor cantidad de biomasa (valor $p = 0.0609$) por conteo en placa es la piedra, seguida por el plástico y la cáscara de coco. Los sólidos suspendidos volátiles en el licor mezcla (valor $p = 0.3228$) y los sólidos suspendidos totales (valor $p = 0.9965$) no son estadísticamente diferentes en los tres tratamientos.
- El soporte con mejores características estadísticas para el tratamiento de aguas residuales textiles es la cáscara de coco, considerando la remoción de DQO,

Bibliografía

AITE. (2012). *Asociación de industrias textiles de Ecuador*. Obtenido de http://www.aite.com.ec/index.php?option=com_content&limitstart=5

Atiaga, O. (2012). *Guía de Prácticas de Laboratorio*. Quito: ESPE.

Ayala, D. (2010). *Obtención de un inóculo bacteriano, proveniente de suelo contaminado por agua residual textil, capaz de degradar colorantes textiles reactivos en condiciones aerobias a escala de laboratorio*. Sangolquí, Ecuador.

CAR/PL. (2002). Prevención de la contaminación en la industria textil en los países del Mediterráneo. *Plan de Acción para el Mediterráneo*, 137-147.

Dirección Metropolitana de Medioambiente. (2010). *Normas técnicas de calidad ambiental*. Obtenido de http://www.ecuadorambiental.com/doc/normas_tecnicas.pdf

Geocities. (2009). *Sistemas alternos de tratamiento de aguas residuales*. Obtenido de <http://www.oocities.org/edrochac/residuales/sistemasalternos6.pdf>

IMBRIUM. (2010). *Tratamiento de aguas residuales*. Obtenido de <http://www.imbrium.com.mx/manuales/IMBRIUM.pdf>

Martí, N. (2006). *Phosphorus precipitation in anaerobic digestion process*. Obtenido de <http://www.bookpump.com/dps/pdf-b/1123329b.pdf>

Moncayo, I. (2010). *Remoción de los colorantes textiles reactivos rojo 141, amarillo 84 y azul navy 171 eliminados en el agua residual, utilizando un inóculo compuesto seleccionado, bajo condiciones anaerobias a nivel de laboratorio*. Sangolquí, Ecuador.

Moreno, C. (2003). Tratamiento de aguas residuales en la embotelladora coca-cola mediante un reactor de lecho fluidizado inverso. *Casa Abierta al Tiempo* .

Morgan, J. M., Revah, S., & Noyola, A. (2000). Malos olores en plantas de tratamiento de aguas residuales: su control. *UNAM* .

Muñoz, D. (2011). *Diseño e implementación de una planta piloto para remoción de dco de aguas residuales de la industria textil, utilizando el inóculo microbiano nativo i5*. Sangolquí, Ecuador: ESPE.

Ojeda, T. (2004). *Manual de análisis de agua*. México: Instituto tecnológico superior de Irapuato.

Pérez, M., Romero, L., & Sales, D. (1997). Inmovilización de biomas a anaerobia termofílica en soportes porosos. *Ingeniería del Agua* , 4 (3), 11-16.

Sanders. (1998). *A manual of field hydrogeology*. Estados Unidos: Prentice - Hall.

STANDARD METHODS 5-17 DQO. (2002). Obtenido de <http://prueba2.aguapedi a.org/master/analisis/protopdf/DQO.pdf>