

## DETERMINACION DE LA PRESENCIA DE HUEVOS Y LARVAS DE *Áscaris lumbricoides* EN EL BIOSOLIDO PROVENIENTE DE LOS BAÑOS ECOLÓGICOS SECOS, EN PROCESO DE COMPOSTAJE EN LAS ZONAS DE VILLA MERCURIO Y SAN ROQUE, EL ALTO

Philip Collender, Raúl D. Silveti, Claudia Sánchez Alarcón, Sergio Quisberth Barrera

### ABSTRACT

Currently many countries are developing organic fertilizer from human waste, such as from urine. (Pradhan et al. 2007) and (Phuc et al. 2006, Tajima 2007) Composted human waste contains micronutrients that can be used as an organic fertilizers in agriculture. These nutrients can also be used in application on forestry with less risk to public health. However, the problem is to obtain a safe use of these organic fertilizers as it is important to demonstrate the absence of pathogens in the final product. The absence of pathogens is important and ideal, the risk of for people to be exposed to pathogens due to composting is quite low. Therefore it is important to demonstrate with indicators the safety of the final product. The "*Ascaris lumbricoides*", can be used as an indicator of the deactivation of all pathogens, as they are very environment resistance.

### Results and Implications

The method used to determine the presence of viable *Ascaris Lumbricoides* eggs in compost samples is taken at different processing times (3, 6, 9, 12 and 20 months). This is based primarily on the visualization and quantification of eggs and cysts, in each stage of development from the embryo, with no evidence of developing embryos, and embryos developed to larvae. The viability count was carried out or moving hatched larvae inside the eggs. To view the viability, recounted the number of larvae hatched or moving inside the eggs

### INTRODUCCIÓN.

Actualmente muchos países se encuentran desarrollando fertilizantes orgánicos a partir de desechos humanos, tales como la orina (Pradhan et al. 2007) y heces (Phuc et al. 2006; Tajima 2007) estos desechos humanos compostados, contienen micro nutrientes que pueden ser utilizados como abonos orgánicos en agricultura. También pueden ser usados estos nutrientes en forestación o aplicaciones con menos riesgo a la salud pública.

Sin embargo el problema que se tiene para garantizar el uso seguro de estos fertilizantes, es demostrar la ausencia de patógenos en el producto final – la ausencia de patógenos es ideal pero también es necesario demostrar que el riesgo de exposición de las personas que podrían estar en contacto directo (agricultores) a los patógenos que existen en compostaje es bastante bajo. Es por esta razón que se ha visto la importancia de contar con indicadores que demuestren la inocuidad del producto final. El *Áscaris Lumbricoides*, puede ser usado como indicador de desactivación de todos patógenos por su característica de ser muy resistente y puede sobrevivir a

condiciones ambientales muy adversas que normalmente desactivan bacterias, virus y otros parásitos (Sanguineti et al. 2009)

Un indicador debe cumplir con ciertos requisitos según la Organización Mundial de la salud (WHO 2004):

- Siempre deben estar presente en los sedimentos en cantidades fácilmente detectables y cuantificables, con razonable precisión y exactitud.
- El indicador debe ser una sola especie o, al menos, un pequeño grupo de especies estrechamente relacionadas.
- Los métodos disponibles preferentemente deben estar estandarizados, deben ser de fácil aplicación y fiables.
- Deben tener una resistencia similar o ligeramente mayor, a los patógenos que estén presentes, durante el tratamiento del sedimento.
- Si el decrecimiento de los patógenos durante del tratamiento es probable, el indicador debe ser capaz de mostrar esto.

La presencia de huevos de *Áscaris Lumbricoides spp*, se usa como indicador

para riesgo de contaminación con otros patógenos como *Toxocara*, *Trichuris Trichura* y huevos de *Hymenolepis nana* (USEPA, 1992), ya que cumple con varios de los requisitos mencionados, debido a que estos huevos son más resistentes que de los otros parásitos entéricos, en condiciones adversas extremas, proporcionando un margen de seguridad en el proceso de tratamiento de residuos orgánicos humanos, además son más fáciles de detectar que los huevos de los otros parásitos (Meyer et al. 1978), y la determinación de su viabilidad es más sencilla con respecto a cestotes como la *Taenia spp* o *Hymenolepis nana spp* (Pike et al. 1983).

### ***Ascaris lumbricoides*.**

El *Ascaris lumbricoides* es el nematodo más grande que parasita al humano, la hembra puede llegar a medir entre 20-35 cm y el macho de 15-30 cm, con un ancho de 4 mm aproximadamente. Es cilíndrico con un extremo posterior puntiagudo y uno anterior romo. La cabeza está provista de tres labios bien diferenciados, los cuales poseen diminutos dientes., que le ayudan a fijarse firmemente a la pared intestinal.

Las hembras pueden llegar a contener hasta 27 millones de huevos y se calcula que la producción diaria oscila por los 200.000 huevos aproximadamente. Se pueden observar dos tipos de huevos: los fecundados y los no-fecundados. Los huevos fecundados son ovalados, de capsula gruesa y transparente formada por tres capas; el interior presenta una masa amorfa de citoplasma. La membrana mas interna es inerte, y debido a su impermeabilidad evita que las sustancias toxicas del medio ambiente puedan lesionar al embrión. Estos huevos son bastante grandes, y miden entre 40-80 micras de largo y 25-50 micras de

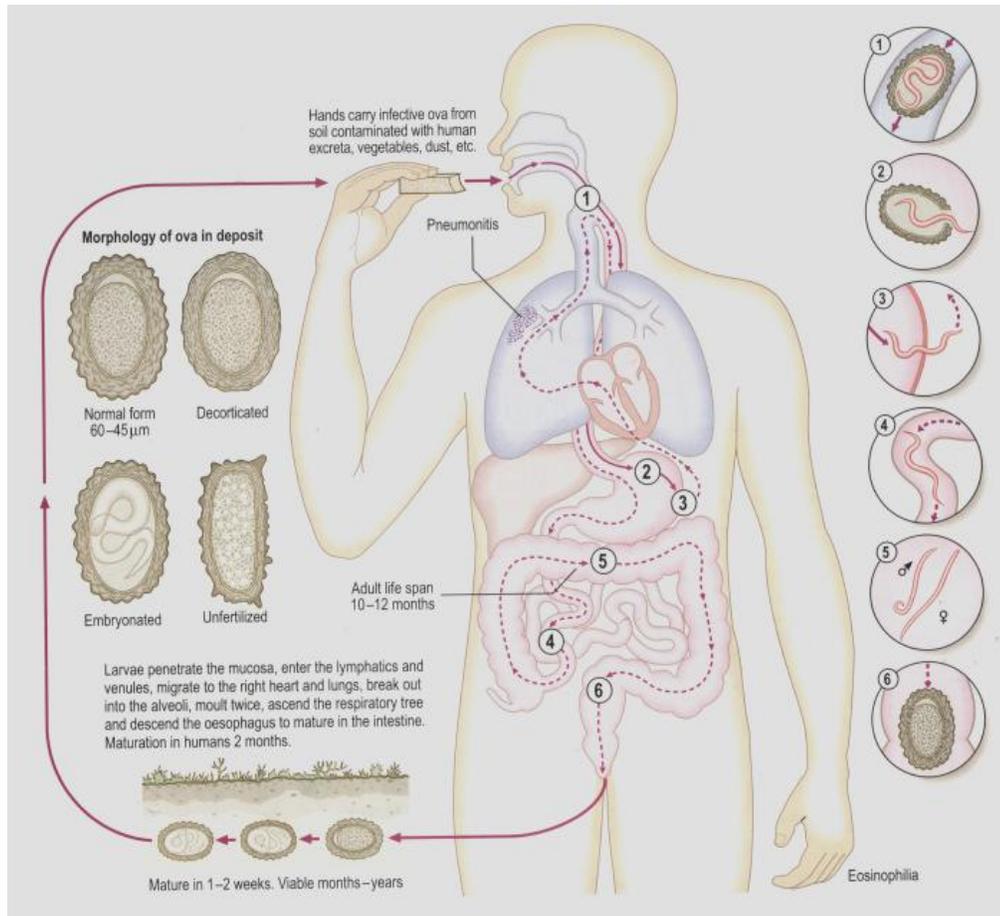
ancho. Los huevos no-fecundados son depositados por las hembras que no se aparean con machos, son mas largos y estrechos, no presentan la membrana interna y su capsula es mucho mas delgada, miden de 85-90 micras de longitud y 30-40 micras de ancho.

### **Ciclo biológico de *Ascaris lumbricoides*.**

La hembra fecundada deposita sus huevos en el intestino, los cuales son eliminados al ambiente junto con las heces, estos huevos carecen de inefectividad en este momento, ya que para serlo debe desarrollarse el embrión en el suelo, en condiciones favorables de temperatura y humedad (medio ambiente propicio), es por esta razón que se le considera un geohelminto, llegando a resistir por lo menos 2 meses, y en medio ambientes favorables, hasta mas que siete años. En el suelo el huevo se transforma en quiste y el embrión que se encuentra en su interior se va desarrollando la larva. Cuando estos huevos/quistes son ingeridos por los seres humanos y alcanzan la segunda porción del duodeno se libera la larva que sigue un ciclo biológico muy complejo en el cuerpo humano (ver figura 1)

La larva mide de 200 a 300 micras, penetra la pared intestinal, alcanzando los vasos mesentéricos pasando así al sistema porta, por donde llega al hígado, allí permanece 3-5 días, aumenta de tamaño hasta alcanzar las 900 micras, luego continua su migración por las venas supra-hepáticas, pasa a la vena cava inferior, luego invade los pulmones, asciende por los bronquiolos, bronquios, tráquea y es deglutida, pasando al esófago, estomago y finalmente llega al intestino delgado donde se desarrolla hasta alcanzar la madurez en aproximadamente 50 días (ver figura 1).

Figura 1. Ciclo biológico de *Ascaris lumbricoides*.



**OBJETIVO**

Determinar la presencia y viabilidad de *Ascaris Lumbricoides* en el proceso de compostaje, de heces humana mezcladas con aserrín, en los centros de tratamiento secundario de residuos orgánicos provenientes de los baños ecológicos secos del "Proyecto de Agua y Saneamiento Básico en Zonas Peri Urbanas de la Ciudad de El Alto con Tecnologías Alternativas", implementados por la Fundación Sumaj Huasi en coordinación con el MMAyA y el apoyo de ASDI / SUECIA, los centros están ubicados en Villa Mercurio y San Roque en la ciudad de El Alto,

**MATERIALES Y MÉTODOS.**

**Área de estudio.**

La Zona de estudio comprendió a barrios del Distrito 7 en los que se construyeron Baños Ecológicos ECOSAN, que se encuentran situados en la ladera Noroeste y Oeste, respectivamente, de la Ciudad de El Alto, son zonas que no cuentan con un sistema de alcantarillado (fecalización al aire libre), es por esta razón que la Fundación Sumaj Huasi desarrollo el proyecto piloto de los baños secos ecológicos, como una forma eficiente de saneamiento y evitar el fecalismo al aire libre en estas zonas.

## Materiales y equipos empleados.

### Reactivos

Limbrox 7X al 1%  
Sulfato de Magnesio (40%)  
Ácido Sulfúrico (0,1 N)  
Agua destilada

### Equipos y material de vidrio

Vasos de precipitados de 1 l  
Licuadora  
Cernidores # 20 y # 400  
Pro pipeta  
Pipetas de 25 ml  
Baja lenguas  
Papel aluminio  
Centrifugadoras  
Tubos falcón 50 ml y 15 ml  
Microscopio  
pH metro  
Balanza gravimétrica de 0-400g

### Material biológico

Muestras compostaje colectadas en Villa Mercurio y San Roque

## Toma de muestra.

Las muestras fueron colectadas en los centros de composteo secundarios de San Roque y Villa Mercurio en siete fechas diferentes (Tabla 1) y corresponden a muestras en diferentes tiempos de procesamiento: 3 meses, 8 meses, 13 meses y 20 meses (San Roque) y 6 meses, 18 meses (Villa Mercurio) (Tabla 2); cada muestra corresponde a una mezcla de muestras tomadas en tres niveles de profundidad de las fosas de compostaje

(superficie primeros 10 cm, centro a unos 20 cm y profunda entre los 40-50 cm) todas estas muestras se encontraban en procesamiento de composta con lombrices, excepto en las muestras de 20 meses de procesamiento final (posterior al tratamiento con lombrices) que corresponde al humus deshidratado y tratado con temperatura entre 70 a 80 °C durante 20 minutos, en un horno de esterilización, las cuales fueron proporcionadas por el Lic. Silveti de la Fundación Sumaj Huasi.

Tabla 1. Toma de muestras según la fecha de colecta.

Fecha	12/06/11	17/06/11	27/06/11	03/07/11	17/07/11	07/08/11	23/08/11	Total
San Roque	1	5	23	1	2			32
Villa Mercurio						1	5	6
<b>Total</b>								<b>38</b>

Tabla 2. Toma de muestras según al tiempo de compostaje

Zona	3 meses	6 meses	8 meses	13 meses	18 meses	20 meses	Total
San Roque	9	0	9	9	0	(humus) 5	32
Villa Mercurio	0	3	0	0	3	0	6
<b>Total</b>	<b>9</b>	<b>3</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>38</b>

## Procesamiento de las muestras.

Se ha seguido el protocolo del "Manual de procedimientos de abono orgánico del Ministerio de Salud de El Salvador, Capítulo; 5.10 Viabilidad de huevos de *Áscaris*, Lic. María Guadalupe de Guzmán Jefe Unidad de Laboratorio Max. Bloch.", recomendado por la Universidad de EMORY, este protocolo, corresponde a los procedimientos de laboratorio realizados en anteriores estudios en Bolivia (IBBA Echalar Seitz 2008) y Centroamérica (Corrales 2006)

Como primer paso se realizó el remojo de las muestras, en vasos de precipitado de 1 litro, previamente etiquetados con su respectivo código. Se pesan 20 gramos de muestra de cada uno de los tres niveles, con la ayuda de un baja lenguas, seguidamente se añade 200 ml de agua destilada y se mezcla hasta homogenizar la preparación, se cubre el vaso con papel aluminio y se lo introduce una bolsa hermética, se deja incubar entre 4 a 10

°C durante toda la noche, con la finalidad de rehidratar la muestra.

Al segundo día, cada muestra es homogenizada en licuadora a máxima velocidad durante un minuto, luego se deja reposar por 15 minutos, y se añade 300 ml de agua destilada, se enjuagan las paredes de la licuadora. Pasado el tiempo de reposo las muestras se homogenizan nuevamente en la licuadora a máxima velocidad por un minuto y posteriormente se trasvasa el homogenizado a su respectivo vaso y se enjuaga la licuadora con agua destilada, se añade limbrox 7X al 0,1% hasta alcanzar un volumen de 900 ml, y nuevamente se cubre el vaso con papel aluminio y se coloca dentro una bolsa, se deja incubando entre 4 a 10°C toda la noche.

Al tercer día, se realiza un primer cernido, se desecha el sobrenadante del vaso de precipitado, dejando en el frasco el sedimento con 100 ml de solución aproximadamente, luego se añade 300 ml de Limbro 7X al 0.1 % y se homogenizo con la ayuda de un baja lenguas durante 5 minutos. La muestra se vacía en un cernidor de porosidad # 20 y se lava el cernidor con ayuda de una pizeta con Limbro 7X al 0.1 %. Luego del lavado se pasa todo el material cernido nuevamente al vaso de precipitado y se completa a un volumen de 900 ml con Limbro 7X al 0.1%, se vuelve a cubrir con papel aluminio y se dejó incubar entre 4 a 10 °C durante toda la noche.

#### **Determinación del pH de las muestras.**

Para la medición del pH se pesó 6.6 gr. de la muestra, de cada nivel, se añadió 20 ml de agua destilada, para obtener un total de 20 gr. se mezcla con ayuda de un baja lenguas y se mide el pH, se utilizo un pH metro Cyber Scan pH 110.

#### **Controles positivos del proceso de incubación.**

Para evaluar si existe la perdida de huevos durante los pasos del protocolo de análisis de las muestras, se prepararon muestras con humus comercial (comprado en un proveedor de abono para jardinería en la zona sur de La Paz) y tierra del Campus Universitario de Cota Cota, en los cuales se

Al cuarto día, se realiza un nuevo cernido, se desecha el sobrenadante, se distribuye el sedimento en forma equitativa en tubos falcon de 50 ml. previamente etiquetados, de 10 a 15 ml por tubo, luego se añadir agua destilada hasta 45 ml, antes de centrifugar se iguala el peso de los tubos y se centrifuga por 10 minutos a 1.000 G (gravedades) o a 2700 r.p.m. Se desecha el sobrenadante dejando solo el sedimento, se agrega una solución de sulfato de magnesio (40%) hasta 45 ml, para permitir la flotación de los huevos, y se centrifugar por 10 minutos a 900 G o 2.500 r.p.m. se vacía el sobrenadante en un cernidor de porosidad # 400 sin dejar caer el precipitado, para eliminar el sulfato de magnesio se lava el cernidor con agua destilada.

Los huevos que se encuentran en el cernidor se recuperan a través de lavados, que se colectan en tubos falcón con la ayuda de un embudo, luego se lleva a centrifugación por 4 minutos a 800 G, se desechó el sobrenadante y se agrega ácido sulfúrico (0,1 N) y se lleva a incubación entre 22° C y 28° C por aproximadamente 18 días, junto al control positivo y se realizan observaciones periódicas para ver el desarrollo de los huevos. Cuando el 90% de los huevos control se han desarrollados al estadio tres, en el que se observa una larva bien definida al interior del huevo, las muestras están listas para el recuento.

depositó una cantidad conocida de huevos de *Ascaris suum* (proporcionado por el CDC/Atlanta) aislado desde heces de cerdo, que se utilizaron como controles positivos.

#### **RESULTADOS**

El método empleado para determinar la presencia de viabilidad de los huevos de áscaris en las muestras de composta, se basa en la visualización y cuantificación de huevos en cada paso de desarrollo en el cual se encontraba el embrión; sin evidencia de desarrollo, contra embriones desarrollados hasta larvas o con embriones que se han destruido. Para ver la viabilidad, se realizo recuento de larvas eclosionadas o con movimiento dentro de los huevos. Sin embargo, esta medida no fue útil en este

estudio por falta de movimiento en la mayoría de las muestras, como en los controles positivos, solamente se observaron larvas inmóviles y semi-digeridas

#### Controles.

No observamos movimiento en los controles de huevos mezclados con humus comercial y suelos. En los controles de huevos puros y

ácido sulfúrico, se observó movimiento de embriones, (estos controles fueron usados para rastrear el desarrollo en las muestras)

Se observaron muchas larvas inmóviles en los controles con humus comercial, pero correspondían al humus sin adición de huevos de *Ascaris L*, e indicaron la presencia de otra especie de geohelminto. La morfología no correspondía al *Ascaris L*

#### Resultados de pH.

**Tabla 3.** Datos obtenidos de la medición de pH de las muestras de compostaje a los diferentes meses de las zonas de San Roque y Villa Mercurio

Zona	Nº Muestras	Tiempo de tratamiento(meses)	pH
San Roque	9	3	7,77 - 8,46
San Roque	9	8	6,20 - 7,10
San Roque	9	13	6,79 - 7,60
San Roque	5 (humus)	20	6,88 - 6,95
Villa Mercurio	3	6	7,16 - 7,72
Villa Mercurio	3	18	6,97 - 8,82

Los resultados obtenidos de las mediciones de los pHs de la zona de San Roque muestran un cambio de pH de básico a ácido, proporcional a los meses de tratamiento de compostaje. Observándose un pH básico a los 3 meses (pH = 8.6 - 7.7), un pH ácido a neutral a los 8 y 13 meses (pH = 6.2 - 7.6) respectivamente y un pH ácido de (pH = 6.8) a los 20 meses en la muestra de humus (Tabla 3).

Los resultados obtenidos de los pHs en la zona de Villa Mercurio muestran que a los 8 meses de tratamiento de compostaje es de un pH neutral (pH = 7) y a los 18 meses de tratamiento de compostaje un pH básico (pH = 8.8), (Tabla 3). Siendo este comportamiento inverso a los obtenidos de la zona de San Roque.

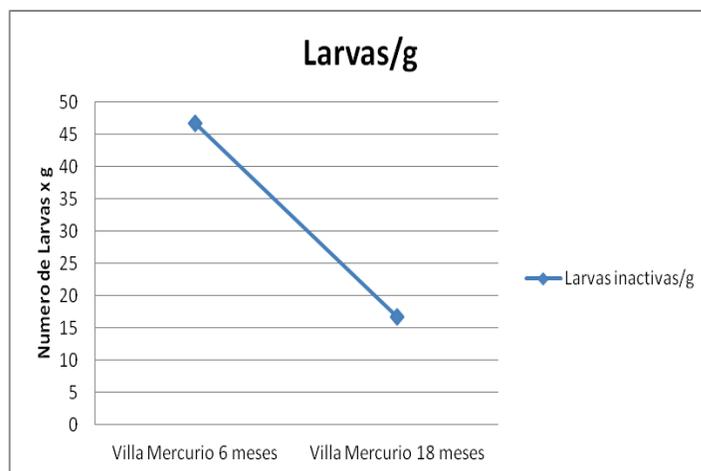
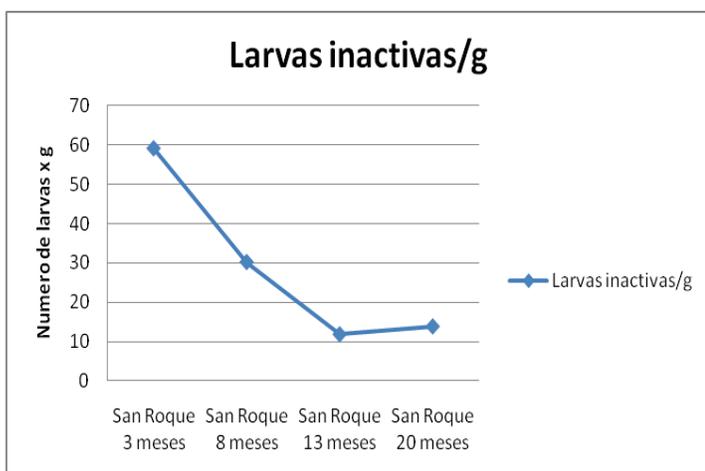
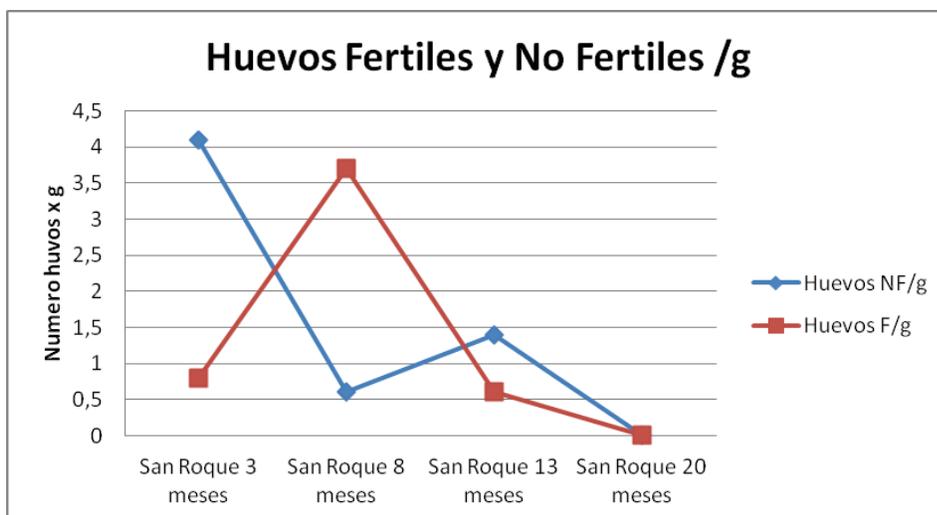
**Tabla 4.** Datos obtenidos de la incubación de las muestras de compostaje a diferentes meses de tratamiento de composta provenientes de las zonas de San Roque y Villa Mercurio.

Zona	Nº muestras	Promedio Huevos NF/g	Promedio Huevos F/g	Promedio Larvas/g
San Roque 3 meses	9	4,1	0,8	59,0
San Roque 8 meses	9	0,6	3,7	30,2
San Roque 13 meses	9	1,4	0,6	11,9
San Roque 20 meses	5	0	0	13,9
Villa Mercurio 6 meses	3	0	1,0	46,7
Villa Mercurio 18 meses	3	0,2	2,2	16,7

NF/g no fértiles por gramo

F/g fértiles por gramo

Larvas se debe entender como inactivas



## San Roque

Los resultados del estudio de nueve muestras que se encontraban en el tercer mes de tratamiento (compostaje) en la Zona de San Roque se observó un alto número de larvas inactivas en comparación a los huevos encontrados. En el caso de los huevos de tercer estadio no se observó movimiento de la larva ya formada en su interior, esta señal nos indica la viabilidad o no viabilidad. También se observa una cantidad importante de huevos sin desarrollo (Tabla 4)

Los resultados obtenidos en las muestras a los ocho meses de tratamiento (compostaje) muestran que, si bien el número de larvas inactivas es menor que la encontrada a los tres meses, se puede ver que existe una alta cantidad de huevos en

tercer estadio, aunque las larvas en desarrollo dentro de los mismos carecían de movimiento.

En las muestras obtenidas a los trece meses de tratamiento (compostaje), se encontró una menor presencia de huevos, esto puede ser debido a que muchos huevos han eclosionado. Entre los pocos huevos en tercer estadio que se detectó, no se observó movimiento. También el número de larvas inactivas se encuentra en menor número con respecto a las anteriores muestras de los diferentes tiempos de compostaje.

Los resultados obtenidos en las muestras colectadas de 20 meses que corresponden al humus procesado y deshidratado listo para la comercialización, se encontró solo la presencia de larvas

inactivas, lo más importante es el hecho de que no se pudo apreciar la presencia de ninguna clase de huevos, ya que en teoría todos los existentes, debieron haber eclosionado en el caso de los huevos fértiles o eliminados por el tratamiento de deshidratación y térmico final al cual se somete el producto antes de estar listo para su utilización.

### Villa Mercurio

En las muestras del sexto de mes tratamiento de compostaje que se colectaron en la zona de Villa Mercurio, no se encontró una cantidad importante de huevos, solo un

huevo de tercer estadio fue observado, además estos no presentaban movimiento, lo cual no nos permitió ver su viabilidad y se encontró gran cantidad de larvas inactivas eclosionadas.

En las muestras de dieciocho meses de tratamiento (compostaje) de Villa Mercurio se observó la presencia de huevos de primer estadio y huevos de tercer estadio los cuales ya presentan la larva formada en su interior, presentaron movimiento, demostrando en este caso la viabilidad de los huevos. Asimismo, se observó una disminución del número de larvas inactivas (Tabla 4).

## DISCUSIONES Y CONCLUSIONES

En todas las muestras existe un número elevado de larvas inactivas esto indica viabilidad de los huevos durante el proceso de compostaje los huevos fértiles eclosionan y las larvas finalmente mueren por falta de el medio ambiente para su desarrollo (tracto intestinal humano).

Aunque las pruebas requieren ajustes, la presencia del estadio infectivo de *Áscaris lumbricoides* en muestras de compostaje con mayor tiempo de procesamiento nos indica que el material aun contiene huevos embrionados, probablemente viables y **no sería completamente apto para su utilización en agricultura sin un tratamiento final (deshidratación y térmico)**

Durante el proceso de incubación de las muestras no se realizó una observación de control de las mismas, siendo la única observación la realizada a los 18 días de incubación, donde se observó, en la mayoría de las muestras un mayor número de larvas inactivas con respecto a los huevos, esto puede deberse a que no se cuantificó la presencia de huevos de tercer estadio antes de la incubación, y que los mismos pueden haber eclosionado durante los 18 días de incubación.

Los pHs en las dos zonas estudiadas son diferentes, en la zona de San Roque (a 3.700 metros de altura, clima frío) donde el pH tiende a ir de básico a ácido esto podría deberse a que existe una degradación mayor

de la materia orgánica en el compostaje contribuyendo a que los huevos eclosionen (dando un ambiente similar al de los jugos gástricos), en la zona Villa Mercurio (a 4.100 metros de altura, clima muy frío) el pH tiende a ir de neutral a básico al parecer este ambiente ayuda a mantener el quiste estable en los huevos fertilizados, a lo largo del procesamiento del compostaje.

No se pudo ver claramente el movimiento de las larvas ya que la placa de recuento utilizada, solo nos permite ver a un aumento de 10x, y el movimiento se puede observar más claramente en un aumento de 40x.

Sin embargo, en las muestras colectadas en la zona de San Roque se observó una disminución del número de larvas inactivas entre el tercer mes y el treceavo mes de tratamiento de compostaje, sin embargo en las muestras de 20 meses de compostaje se observó un número algo mayor de larvas inactivas. Esto demuestra que el tratamiento de compostaje logra disminuir la presencia de huevos entre los meses del procesamiento, pero este no logra eliminar por completo la viabilidad de los áscaris ya que se han observado huevos de tercer estadio, **lo que reafirma la necesidad de un tratamiento final de deshidratación y térmico.**

El presente trabajo tiene resultados preliminares que pueden ser utilizados como referencia para futuros trabajos, para determinar la presencia de huevos y larvas de *áscaris lumbricoides* en diferentes

estadios en fosas de compostaje a diferentes tiempos de procesamiento, en las zonas de Villa Mercurio y San Roque de el Alto.

### LIMITACIONES Y LECCIONES APRENDIDAS

La toma de las muestras se realizó de diferentes fosas de compostaje, que se encuentran en diferentes periodos de compostaje, no se realizó el seguimiento de una sola fosa, esto nos hubiera ayudado a determinar mejor la cantidad de huevos y larvas desde el inicio del proceso de composta sin factores de confusión de prevalencias diferentes de *Áscaris* en cada época en que se inicio el compostaje de las heces.

Antes de llevar a incubación debe observarse la existencia huevos fértiles y no fértiles y realizar un recuento inicial de los

mismos y hacer las observaciones de monitorización cada 2 o 3 días para tener una mejor valoración de la viabilidad de *Áscaris Lumbricoides*, se debe probar con otro tipo de cámara de recuento por Ejemplo las que se usan en hematología.

Se requiere hacer un mayor número de análisis por punto de muestreo a diferente tiempo de compostaje para realizar su valoración estadística.

Hay que ver que condiciones son las que contribuyen a la eclosión de huevos de *Ascaris L.*, para entender la observación del el alto numero de larvas encontradas afuera de los huevos. También, hay que revisar el protocolo y los huevos usados como controles para definir el porque de la falta de movimiento de los embriones, como determinación de la viabilidad.

### BIBLIOGRAFÍA.

- ❖ Sanguineti Graciela Sussana, Ingallinella Ana Maria, Ferrer Valeria. (2009) *Inactivacion de patógenos en heces provenientes de baño ecológico - disposición de aguas grises*, 6 -9-12
- ❖ Crompton DTW (1999). How much human helminthiasis is there in the world?. *J Parasitol.* 85: 397-403.
- ❖ Meyer KB, Miller KD, Kaneshiro ES (1978). Recovery of *Ascaris* eggs from sludge. *Journal of Parasitology.* 64: 380-383.
- ❖ Phuc PD, Konradsen F, Phuong PT, Cam PD, Dalsgaard A (2006). Practice of using human excreta as fertilizer and implications for health in Nghean province, Vietnam. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 37: 222-229.
- ❖ Pike EB, Morris DL, Carrington EG (1983). Inactivation of ova of the parasites *Taenia saginata* and *Ascaris suum* during heated anaerobic digestion. *Water Pollution Control.* 82: 501-509.
- ❖ Pradhan S, Nerg AM, Sjöblom A, Holopainen J, Heinonen-Tanski H (2007). Use of Human Urine Fertilizer in Cultivation of Cabbage (*Brassica oleracea*); Impacts on Chemical, Microbial, and Flavor Quality. *J. Agric. Food Chem.* 55: 8657–8663.
- ❖ Tajima K (2007). The marketing of urban Human Waste in the Early Modern Edo/Tokyo Metropolitan Area. *Environnement Urbain Urban Environment.* 1: a13-a30.
- ❖ USEPA (1992). Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge. EPA/625/R-92/013, Environmental Regulation and Technology; United States of Environmental Protection Agency.
- ❖ World Health Organization (2004). Integrated Guide to Sanitary Parasitology. WHO-EM/CEH/121/E. ISBN 92-9021-386-8.