



COMUNICADO  
TÉCNICO

483

Colombo, PR  
Novembro, 2022



## Protocolo para a determinação da enzima urease em amostras de solos

Krisle da Silva  
Rafael Hennel Tulio

## Protocolo para a determinação da enzima urease em amostras de solos

---

**Krisle da Silva**, Engenheira-agrônoma, doutora em Microbiologia agrícola, pesquisadora da Embrapa Florestas, Colombo, PR; **Rafael Hennel Túlio**, graduado em Ciências Biológicas, doutorando em Ciências do Solo, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

A decomposição da matéria orgânica e o ciclagem de nutrientes são processos complexos que necessitam da ação de múltiplos organismos. Os microrganismos do solo sintetizam e liberam diferentes enzimas extracelulares, que ajudam a despolimerizar e mineralizar compostos orgânicos complexos em moléculas menores, podendo ser assimiladas por outros organismos (Wang et al., 2016; Cordero et al., 2019). A maioria do nitrogênio (N) no solo é encontrada em compostos orgânicos e sua hidrólise ocorre por enzimas chamadas de hidrolases amídicas. Dentre estas, existe uma enzima denominada urease que está associada à transformação, renovação biológica e disponibilidade de nitrogênio (Lanna et al., 2010; Zhang et al., 2014).

A urease constitui um grupo de enzimas encontrada na natureza, sendo produzida por bactérias, fungos, plantas, algas, invertebrados e ainda pode ser encontrada em resíduos animais (Modolo et al., 2018; Pacheco; Cola, 2019). Esta enzima pertence à família das amidohidrolases e fosfotriestrases, cuja principal característica é a presença de centros metálicos em seus sítios ativos, sendo a urease a única enzima

que possui níquel (Ni) em seu sítio ativo (Krajewska, 2009; Mazzei et al., 2020). Sua função é catalisar a hidrólise da ureia em meio aquoso, produzindo dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) e duas moléculas de amônia ( $\text{NH}_3+$ ), o  $\text{CO}_2$  em contato com o meio aquoso resulta na oxidação à ácido carbônico ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ) (Almeida et al., 2008; Krajewska, 2009).

A maioria dos métodos de ensaio da atividade da enzima urease do solo envolve a estimativa do  $\text{NH}_3+$  liberado na incubação de solo, pela estimativa da ureia durante o processo de hidrólise ou pela estimativa de  $\text{CO}_2$  produzido (Tabatabai, 1972; Pacheco; Cola, 2019). Mas, dentre os métodos utilizados, o mais difundido para medir a atividade da enzima urease foi desenvolvido em 1988, por Kandeler e Gerber. Desta forma, este documento descreve a determinação da atividade da urease baseada na metodologia descrita por Kandeler e Gerber (1988) com modificações. Este protocolo determina a urease pelo método tamponado, utilizando o tampão borato. As adaptações foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa Florestas.

## Material e equipamentos necessários

- Frascos de vidros com tampa
- Béquer;
- Espátula para pesagem de reagentes;
- Proveta;
- Pipeta;
- Bastão de vidro;
- Balão volumétrico;
- Erlenmeyer ou frasco para armazenamento;
- Microtubos de 2 mL para centrifugação;
- Bandeja;
- Micropipetas;
- Dispensador automático;
- Agitador magnético;
- Balança;
- pHmetro;
- Espectrofotômetro;
- Incubadora;
- Agitador de bancada;
- Balança analítica;
- Geladeira;
- Centrifuga;
- Capsulas de porcelana;

- Estufa de secagem;
- Dessecador;
- Sílica.

## Reagentes e soluções

### a) Solução NaOH (20%)

Dissolver 20 g de NaOH em 50 mL de água deionizada. Avolumar com água deionizada em balão de 100 mL.

### b) Tampão Borato

Dissolver 30 g de tetraborato de sódio (livre de água) em 1.500 mL de água deionizada quente. Após esfriar, ajustar o pH para 10, com NaOH (20%). Avolumar com água deionizada em balão de 2.000 mL.

### c) Solução de ureia

Dissolver 2,4 g de ureia em 400 mL de água deionizada. Avolumar com água deionizada em balão de 500 mL. (Atenção, essa solução deve ser preparada no dia da análise).

### d) Solução HCl 1 M

Considerando que o HCl com 37% de pureza tem molaridade igual a 10 M, para obter uma solução HCl 1 M deve ser diluída 1:10. Para tanto, adicionar aproximadamente 70 mL de água deionizada em um balão volumétrico de 100 mL e adicionar, cuidadosamente, 3,7 mL de HCl P.A. Sempre adicione o ácido na água, jamais o contrário. Avolumar com água deionizada.

**e) Solução de KCl acidificado**

Dissolver 74,6 g de KCl em 300 mL de água deionizada e adicionar 10 mL de HCl 1 M (3,7%). Avolumar com água deionizada em balão de 1.000 mL.

**f) Solução de NaOH**

Dissolver 12 g de NaOH em 700 mL de água deionizada. Avolumar com água deionizada em balão de 1.000 mL.

**g) Solução de salicilato de sódio/ nitroprussiato de sódio**

Dissolver 17 g de salicilato de sódio e 120 mg de nitroprussiato de sódio em 70 mL de água deionizada. Avolumar com água deionizada em balão de 100 mL.

**h) Solução de salicilato de sódio/ solução de NaOH**

Misturar igual volume (1:1:1) das soluções de salicilato de sódio, NaOH e água deionizada. **ATENÇÃO:** Deve ser preparada no dia da análise.

**i) Solução de dicloroisocianurato de sódio 0,1%**

Dissolver 0,1 g de dicloroisocianurato de sódio 0,1% em 90 mL de água deionizada. Avolumar com água deionizada em balão de 100 mL. **ATENÇÃO:** preparar a solução rapidamente e imediatamente antes de sua utilização, no dia da análise. Uma modificação da metodologia foi utilizar dicloroisocianurato de sódio presente em desinfetante para piscina, contendo 40% de sódio, que é barato e de fácil aquisição.

**j) Solução de cloreto de amônio**

Dissolver 0,382 g de cloreto de amônio em 70 mL de água destilada. Avolumar com água deionizada em balão de 100 mL. (1.000 µg NH<sub>4</sub>-N mL<sup>-1</sup>). A solução é estável por diversas semanas sob temperatura de 4 °C.

**Determinação da umidade do solo**

Para o cálculo da atividade da urease, é necessária a determinação do peso seco do solo. Para isso, deve-se determinar a umidade do solo. Adiante segue a metodologia utilizada para esta determinação.

- Pesas as cápsulas de porcelana vazias, previamente secas em estufa por, no mínimo, duas horas. Retirar da estufa, acondicionar em dessecador até o equilíbrio da temperatura e, em seguida, pesar e anotar a massa da cápsula. Tarar a balança.
- Pesas 10 g de solo e anotar a massa ( $\mu$  = massa úmida)
- Deixar secar em estufa por 24 horas.
- Após secar, as cápsulas contendo a amostra devem ser acondicionadas em dessecador até o equilíbrio da temperatura e, em seguida, pesadas. Anotar a massa de cada cápsula sendo  $m_s$  = massa seca.

### Cálculo da umidade:

$$\text{Umidade \%} = \frac{(\mu - ms)}{\mu} \times 100$$

Equação 1- Cálculo da umidade

### Onde:

$\mu$  = massa úmida

$ms$  = massa seca

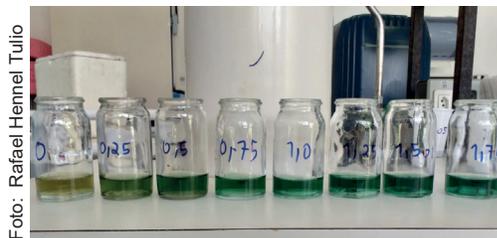
## Construção da curva de calibração

Em um tubo de ensaio de vidro, pipetar 1 mL da solução de cloreto de amônio e 9 mL da solução de KCl. Esta solução conterá 100  $\mu\text{g NH}_4\text{-N mL}^{-1}$ . Da solução contendo 100  $\mu\text{g NH}_4\text{-N mL}^{-1}$ , pipetar 1 mL e diluir em 9 mL de água destilada. Esta solução passará a 10  $\mu\text{g NH}_4\text{-N mL}^{-1}$ . A partir desta solução, será construída a curva de calibração de acordo com a Tabela 1 e Figura 1.

**Tabela 1.** Curva de calibração para determinação da concentração de amônio.

| Concentração de $\text{NH}_4\text{-N}$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) | Solução contendo 10 $\mu\text{g NH}_4\text{-N mL}^{-1}$ (mL) | Água destilada (mL) |
|--|--|---------------------|
| 0,00   | 0  | 9,00*               |
| 0,50   | 0,5  | 9,50                |
| 1,00   | 1,0  | 9,00                |
| 1,25   | 1,25   | 8,75                |
| 1,50   | 1,50   | 8,50                |
| 1,75   | 1,75   | 8,25                |

\*Adicionar 1 mL da solução de KCl acidificada diluída (10x em água), para completar os 10 mL da concentração 0  $\mu\text{g NH}_4\text{-N mL}^{-1}$ .



**Figura 1.** Curva de calibração para a determinação da concentração de amônio ( $\text{NH}_4\text{-N}$  ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )).

## Determinação da urease

- Pesar 5 g de solo em fracos de vidro de 100 mL com tampa (fazer em triplicatas).
- Pipetar 5 mL de água destilada que será o branco (triplicatas).
- Adicionar 2,5 mL de solução de ureia e 20 mL de tampão borato (não adicionar ureia no branco).
- Incubar as amostras sob temperatura de 37 °C, por duas horas, em incubadora.
- Interromper reação com a adição de 30 mL da solução de KCL acidificado e agitar por 30 minutos.
- Imediatamente após adicionar à solução do KCL no branco, adicione 2,5 mL da solução de ureia.
- Transferir alíquotas de 1,4 mL da suspensão de solo para microtubos de 2 mL e centrifugar a 14.000 rpm, por 10 minutos. Na metodologia original

utiliza-se a filtração. No entanto, a centrifugação é rápida e mostrou-se suficiente.

- Retirar 1 mL do sobrenadante e adicionar 9 mL de água deionizada, 5 mL da solução salicilato/nitroprussiato de sódio e 2 mL da solução de dicloroiso-cianúrico, deixar 1 hora em repouso, sob temperatura ambiente.
- Determinar a densidade ótica a 690 nm, em espectrofotômetro.
- Para a curva de calibração, adicionar os 5 mL da solução salicilato/nitroprussiato de sódio e 2 mL da solução de dicloroisocianurato de sódio e deixar em repouso e fazer a leitura a mesma forma feita para as amostras.
- Utilizar o zero da curva de calibração para zerar o espectrofotômetro.

## Cálculo da atividade da urease:

$$\text{Urease } \mu\text{g NH}_4\text{-N g solo}^{-1} \text{ 2h}^{-1} = \frac{[\text{NH}_4] \mu\text{g mL}^{-1} \times V \times 10}{(\text{PS} \times 5)}$$

Equação 2.

### Onde:

- V: volume total de extrato (52,5 mL)
- 10: fator de diluição
- PS: Peso seco de uma grama de solo

## Considerações finais

A técnica se mostrou viável, barata e de fácil execução em qualquer laboratório. As adaptações se mostraram eficientes, com economia de tempo e recursos, e de fácil execução laboratorial.

Este trabalho apresenta aderência a diferentes metas dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) estabelecidos pela Agenda 2030 da Organização das Nações Unidas (ONU), em especial àquelas do ODS 12, pois trata-se de uma metodologia científica possível de utilização para monitorar problemas edáficos relacionados à decomposição da matéria orgânica e a ciclagem de nutrientes.

## Referências

- ALMEIDA, de V.; BONAFÉ, E. G.; STEVANATO, F. B.; SOUZA, N. E. de; VISENTAINER, J. E. L.; MATSUSHITA, M.; VISENTAINER, J. V. Catalisando a hidrólise da uréia em urina. **Química Nova na Escola**, n. 28, p. 42-46, maio, 2008. Disponível em: <http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc28/10-EEQ-5506.pdf>. Acesso em: 23 ago. 2022.
- CORDERO, I.; SNELL, H.; BARDGETT, R. D. High throughput method for measuring urease activity in soil. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 134, p. 72-77, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.03.014>.
- KANDELER, E.; GERBER, H. Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. **Biology and Fertility of Soils**, v. 6, n. 1, p. 68-72, 1988. DOI: <https://doi.org/10.1007/bf00257924>.
- KRAJEWSKA, B. Ureasas I. Functional, catalytic and kinetic properties: a review. **Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic**, v. 59, n. 1-3, p. 9-21, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.01.003>.

LANNA, A. C.; SILVEIRA, P. M. da; SILVA, M. B. da; FERRARESI, T. M.; KLIEMANN, H. J. Atividade de urease no solo com feijoeiro influenciada pela cobertura vegetal e sistemas de plantio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 6, p. 1933-1939, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/s0100-06832010000600018>.

MAZZEI, L.; MUSIANI, F.; CIURLI, S. The structure-based reaction mechanism of urease, a nickel dependent enzyme: tale of a long debate. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**: JBIC: a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry, v. 25, n. 6, p. 829-845, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00775-020-01808-w>.

MODOLO, L. V.; DA-SILVA, C. J.; BRANDÃO, D. S.; CHAVES, I. S. A minireview on what we have learned about urease inhibitors of agricultural interest since mid-2000s. **Journal of Advanced Research**, v. 13, p. 29-37, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.04.001>.

PACHECO, V.; COLLA, L. A enzima urease e suas aplicações na agricultura, medicina e engenharia. **Revista CIATEC-UPF**, v. 11, n. 2, p. 1-21, 2019. DOI: <https://doi.org/10.5335/ciatec.v11i2.8429>.

TABATABAI, M. A.; BREMNER, J. M. Assay of urease activity in soils. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 4, n. 4, p. 479-487, 1972. DOI: [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(72\)90064-8](https://doi.org/10.1016/0038-0717(72)90064-8).

WANG, W.; PAGE-DUMROESE, D.; LV, R.; XIAO, C.; LI, G.; LIU, Y. Soil enzyme activities in *Pinus tabuliformis* (carrière) plantations in northern China. **Forests**, v. 7, n. 12, p. 112, 2016. 12 p. DOI: <https://doi.org/10.3390/f7060112>.

ZHANG, T.; WAN, S.; KANG, Y.; FENG, H. Urease activity and its relationships to soil physiochemical properties in a highly saline-sodic soil. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 14, n. 2, p. 304-315, 2014. DOI: <https://doi.org/10.4067/s0718-95162014005000025>.

#### Embrapa Florestas

Estrada da Ribeira, km 111, Guaraituba,  
Caixa Postal 319  
83411-000, Colombo, PR, Brasil  
Fone: (41) 3675-5600  
[www.embrapa.br/florestas](http://www.embrapa.br/florestas)  
[www.embrapa.br](http://www.embrapa.br)  
[www.embrapa.br/fale-conosco/sac](http://www.embrapa.br/fale-conosco/sac)

1ª edição

Publicação digital (2022): PDF



MINISTÉRIO DA  
AGRICULTURA, PECUÁRIA  
E ABASTECIMENTO



#### Comitê Local de Publicações da Embrapa Florestas

Presidente

*Patrícia Póvoa de Mattos*

Vice-Presidente

*José Elidney Pinto Júnior*

Secretária-Executiva

*Elisabete Marques Oaida*

Membros

*Annete Bonnet*

*Cristiane Aparecida Fioravante Reis*

*Elenice Fritzsos*

*Krisle da Silva*

*Marcelo Francina Arco-Verde*

*Marilice Cordeiro Garrastazu*

*Susete do Rocio Chiarello Penteado*

*Valderés Aparecida de Sousa*

Supervisão editorial/Revisão de texto

*José Elidney Pinto Júnior*

Normalização bibliográfica

*Valéria de Fátima Cardoso*

Projeto gráfico da coleção

*Carlos Eduardo Felice Barbeiro*

Editoração eletrônica

*Luciane Cristine Jaques*

Foto capa

*Rafael Hennel Tulio*

CGPE: 017845