

HIDRÓLISE DA URÉIA EM LATOSSOLOS: EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE URÉIA, TEMPERATURA, pH, ARMAZENAMENTO E TEMPO DE INCUBAÇÃO⁽¹⁾

Regina Marcia Longo⁽²⁾ & Wanderley José de Melo⁽³⁾

RESUMO

Este trabalho objetivou estudar a velocidade de hidrólise da uréia em dois diferentes solos brasileiros (Latossolo Vermelho Aluminoférrico típico e Latossolo Vermelho distrófico típico) onde foram realizados ensaios sobre o efeito do tempo e condições de armazenamento, concentração do substrato (uréia), temperatura, pH e tempo de incubação sobre a atividade da urease. As melhores condições de armazenamento foram em temperatura ambiente ou 5 °C, após secagem ao ar, por um período de até 7 dias; para as condições estudadas, o melhor tempo de incubação foi de uma hora a 25–30 °C, sem a utilização de tampão para acertar o pH, e a concentração de uréia suficiente foi de 3,30 g L⁻¹, para o Latossolo Vermelho Aluminoférrico típico, e de 2,5 g L⁻¹, para o Latossolo Vermelho distrófico típico para obter a velocidade máxima da enzima.

Termos de indexação: enzima do solo, atividade enzimática, urease, atividade microbiana do solo.

SUMMARY: *UREA HYDROLYSIS IN OXISOLS: EFFECTS OF SUBSTRATE CONCENTRATION, TEMPERATURE, pH, INCUBATION TIME AND STORAGE CONDITIONS*

This study evaluated the kinetics of urease hydrolysis in two different Brazilian soils (Rhodic Oxisols): a typic alumino-ferric Red Latosol and a typic dystrophic Red Latosol. The trials were carried out to study the effects of air drying, soil sampling, storage conditions and temperature, pH, time of incubation, and substrate concentration on the urease activity. Results showed that best conditions for soil sample storage after air-drying for a 7-day

⁽¹⁾ Recebido para publicação em junho de 2000 e aprovado em fevereiro de 2005.

⁽²⁾ Engenheira-Agrônoma e Doutora em Engenharia de Água e Solo pela Universidade de Campinas – UNICAMP. Estrada da Rhodia, 5555, cs 91, Barão Geraldo, CEP 13085-850 Campinas (SP). Email: rmlongo@uol.com.br

⁽³⁾ Professor Titular do Departamento de Tecnologia, Universidade Estadual Paulista – UNESP/Jaboticabal. Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n, CEP 14884-900 Jaboticabal (SP). Email: wjmelo@fcav.unesp.br

period were at room temperature or at a temperature of 5 °C. For the studied conditions the best incubation time was one hour at 25-30 °C, without pH buffering. The ideal urea concentration suggested for the detection of the maximum velocity was 3.3 g L⁻¹ for the typic alumino-ferric Red Latossol and 2.5 g L⁻¹ for the typic dystrophic Red Latosol.

Index terms: soil enzyme, enzymatic activity, urease, soil microbiol activity.

INTRODUÇÃO

A urease é a enzima que catalisa a hidrólise da uréia para dióxido de carbono e amônia, afetando a utilização desse importante fertilizante nitrogenado. Sua ocorrência é grande em plantas e microrganismos (particularmente as bactérias) e tem sido detectada na mucosa gástrica do homem e de alguns animais. Sua presença em solo foi primeiro indicado por Rotini (1935), depois surgiram os trabalhos publicados por Conrad (1940a,b; 1942a,b, 1943), evidenciando que os solos continham urease e indicando ser tal enzima responsável pela conversão do nitrogênio da uréia em amônia. Trabalhos recentes foram também realizados por alguns autores (Klose & Tabatabai, 1999; Benini et al., 1999).

Dentre os fatores que influem na atividade enzimática do solo estão a concentração do substrato, nível de umidade, temperatura e pH do solo (Santos et al., 1991; Silva et al., 1995; Arunachalan & Melkania, 1999).

Estudos sobre a concentração de uréia em teste de atividade da urease mostraram que a velocidade de hidrólise da uréia é aumentada com o acréscimo na concentração do substrato, até atingir uma quantidade de uréia adicionada suficiente para saturar a enzima (Douglas & Bremner, 1971; Tabatabai & Bremner, 1972; Dalal, 1975; Zantua & Bremner, 1977). Alguns autores têm demonstrado que a atividade da urease no solo não é alterada pelo nível de umidade (Zantua & Bremner, 1977), enquanto outros demonstraram que esta é aumentada por um decréscimo no nível de água no solo (Gould et al., 1973).

Alguns estudos têm mostrado que a atividade da urease é aumentada com um aumento de temperatura de 10 a 40 °C (Bremner & Mulvaney, 1978 e Longo et al., 1991). Zantua & Bremner (1977) observaram que a atividade aumentou significativamente com um aumento de temperatura de 40 a 70 °C, mas houve um decréscimo rápido de 70 a 80 °C.

Estudos relativos ao uso de tampão para determinar o efeito do pH na atividade da urease foram realizados por Pettit et al. (1976) que encontraram um pH ótimo para a urease do solo entre 6,5 e 7,0. Tabatabai & Bremner (1972) e May & Douglas (1976) constataram que a faixa ótima de pH do solo situa-se entre 8,8 e 9,0.

De forma geral, a avaliação da atividade enzimática é essencial para entender uma série de processos ocorridos no solo, inclusive para o monitoramento e entendimento das atividades poluidoras e degradadoras do solo (Margesin et al., 2000; Taylor et al., 2002). Neste contexto, a utilização de métodos condizentes com as condições tropicais torna-se de suma importância.

A revisão de literatura sobre a atividade da urease em condições tropicais revelou um grande vazio de informações. Sendo assim, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da secagem do solo ao ar, condições e tempo de armazenamento, temperatura, pH, tempo de incubação e concentração do substrato no comportamento cinético da urease em dois solos de regiões tropicais.

MATERIAL E MÉTODOS

Os testes foram realizados em amostras de Latossolo Vermelho Aluminoférrico típico (LVaf) e Latossolo Vermelho distrófico típico (LVd) (Embrapa, 1999), na fazenda experimental da Faculdade de Ciências Agrária e Veterinária, campus de Jaboticabal (SP), estando os solos em estudo sob a vegetação de pinus.

As amostras foram obtidas na profundidade de 0–20 cm, sendo retiradas 20 amostras simples de cada área, formando amostras compostas, representativas dos dois solos, com as quais foram realizados estudos sobre o efeito da secagem ao ar, das condições e tempo de armazenamento, da temperatura, do pH, do tempo de incubação e da concentração de substrato.

A taxa de hidrólise da uréia, que é função da atividade da urease, foi determinada seguindo o método proposto por May & Douglas (1976). Tomaram-se 3,0 g de solo seco ao ar, adicionando-se 0,5 mL de tolueno e 12,0 mL de tampão fosfato (pH 8,8); em seguida, procedeu-se à incubação a 37°C por 10 min e adicionaram-se 3,0 mL da solução de uréia. Após 4 h de incubação (37 °C), acrescentaram-se 15 mL de solução de KCl 2 mol L⁻¹, com 5 mg de acetato de fenil mercúrio. A mistura foi agitada por 5 min e, em seguida, procedeu-se à filtração. No filtrado, foi determinado o teor de N-amoniacoal trocável, fazendo-se uso do método de destilação a

vapor (Bremner & Keeney, 1965). Para cada tratamento executou-se um branco, da maneira supradescrita, porém adicionando-se a solução de uréia após a solução de KCl + acetato de fenil mercúrio. Foram utilizados 10 mL do filtrado para a destilação e, em seguida, titulou-se com solução padronizada de ácido sulfúrico 0,001 mol L⁻¹.

Os testes de secagem ao ar foram realizados, fazendo-se uso do solo recém-amostrado e após secagem ao ar por dois dias.

O efeito das condições de armazenamento foi observado em amostras recém-coletadas e secas em temperatura ambiente (25–30 °C), sendo as amostras armazenadas em temperatura ambiente, a 5 °C (armazenamento em geladeira) e -20 (armazenamento em freezer). A determinação da velocidade de hidrólise da uréia foi feita após 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento.

O efeito do tempo de incubação foi avaliado apenas alterando-se o tempo de incubação de 4 para períodos de 1 a 8 h de incubação, em intervalos de uma hora.

Para verificar o efeito da concentração do substrato, substituiu-se a solução de uréia indicada no método (2,145 g L⁻¹ de uréia) pelo mesmo volume de solução que continha diferentes concentrações: 0,04; 0,08; 0,31; 0,42; 0,50; 0,62; 0,83; 1,25; 1,67; 2,50; 3,3; 4,0 e 5,0 g L⁻¹.

Para estudar o efeito da temperatura de incubação, fez-se uso do método proposto, alterando-se a temperatura proposta (37 °C) para as seguintes: 5, 10, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70 e 80 °C.

Para avaliar o efeito do pH, usou-se o método proposto, substituindo-se o tampão fosfato com pH 8,8 por soluções tampões com pH igual a 2,2; 2,8; 3,4; 4,0; 4,6; 5,2; 5,8; 6,4; 7,0 e 8,0.

Para analisar os dados, utilizou-se um delineamento experimental inteiramente casualizado, em que os tratamentos foram cada uma das variáveis em estudo, com três repetições. Nos casos em que o valor de F foi significativo ($p \leq 0,05$), aplicou-se o teste de Tukey para comparação das médias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Condições de armazenamento do solo

A secagem ao ar determinou aumento na velocidade de hidrólise da urease em se tratando do Latossolo Vermelho distrófico (F = 14,90**), não alterando, todavia, os resultados ao se considerar o Latossolo Vermelho Aluminoférrico (Quadro 1). Speir et al. (1980) observaram que a secagem ao ar teve pouca ou nenhuma influência sobre a atividade da urease em dois solos estudados, mas causou diminuição na atividade de um terceiro.

Quadro 1. Velocidade de hidrólise da uréia em amostras de Latossolo Vermelho Aluminoférrico típico e Latossolo Vermelho distrófico típico recém-colhidas e após secagem ao ar

Tratamento	Atividade da urease na TFSA (mg dm ⁻³ de N-NH ₄ 4 h ⁻¹)	
	LVaf	LVd
Úmido	16,97 a	15,95 a
Seco ao ar	16,42 a	17,0 b
F (trat)	0,88 ^{ns}	14,90**
CV (%)	8,13	3,51

** e ^{ns}: Significativo a 5 % e não-significativo.

De forma geral, a secagem ao ar pode ou não alterar a hidrólise da uréia tanto de forma positiva como negativa. Cumpre observar que o método utilizado determina a atividade das exoenzimas, ou seja, aquelas que se encontram desvinculadas dos organismos vivos ou, no máximo, ligadas à parte externa da parede celular. Durante a secagem do solo, forças físicas e o próprio déficit em água determinariam a morte das células, colocando no solo novas exoenzimas, o que levaria a um aumento na atividade ureolítica.

Do exposto, pode-se concluir que o efeito da secagem ao ar sobre a hidrólise da uréia varia com o tipo de solo, sendo necessário um estudo preliminar para se optar pela secagem ao ar ou não. De forma geral, é recomendável, sempre que possível, trabalhar com amostras recém-coletadas.

Os resultados obtidos para o efeito das condições de umidade e tempo de armazenamento encontram-se apresentados na figura 1. Tanto para o Latossolo Vermelho Aluminoférrico típico quanto para o Latossolo Vermelho distrófico típico, a velocidade de hidrólise da uréia variou com o tempo e condições de armazenamento.

No caso do Latossolo Vermelho Aluminoférrico típico, a velocidade de hidrólise da uréia caiu até o 28º dia de armazenamento, para os seis tratamentos ensaiados (CV = 10,28 %), sendo o tratamento AS5 o único em que a atividade aos 28 dias não diferiu do início (Figura 1a). As amostras de Latossolo Vermelho distrófico típico (CV = 5,79 %) tiveram um comportamento diferenciado, ocorrendo do início até o 14º dia de armazenamento uma tendência de diminuição na velocidade de hidrólise da uréia em praticamente todos os tratamentos (exceto SA5). Depois, houve uma tendência de aumento, sendo mais acentuado nos tratamentos em que as amostras foram secas ao ar (Figura 1b).

A análise dos dados revelou que o tipo de solo influencia a possibilidade de armazenamento das

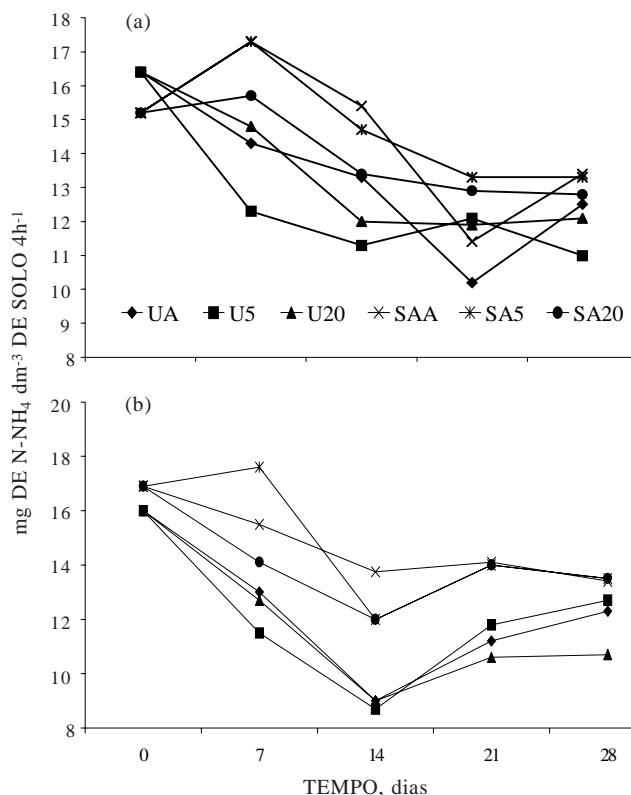


Figura 1. Efeito do tempo e condições de armazenamento sobre a velocidade de hidrólise da uréia (mg de N-NH₄ dm⁻³ de solo 4 h⁻¹), em amostras de Latossolo Vermelho Aluminoférrico típico (a) e Latossolo Vermelho distrófico típico (b), em que: UA = úmida em temperatura ambiente; U5 = úmida a 5 °C; U20 = úmida a -20 °C; SAA = seca ao ar em temperatura ambiente; SA5 = seca ao ar a 5 °C; SA20 = seca ao ar a -20 °C.

amostras de terra para a determinação da atividade da urease. No caso, o Latossolo Vermelho distrófico típico evidenciou uma urease mais susceptível a perdas de atividade, o que pode ser atribuído ao fato de, provavelmente, o solo apresentar menor teor de argila e de matéria orgânica, os quais são responsáveis pela complexação da enzima e pela manutenção de sua atividade.

De modo geral, quando as amostras de solo foram armazenadas após a secagem ao ar e mantidas em temperatura ambiente ou a 5 °C, tolerou-se um armazenamento por 7 dias, sem que a atividade da urease se modificasse de modo significativo.

Tempo de incubação

Analisando a figura 2, verificou-se que a produção de N-H(NH₄) aumentou de modo significativo de uma a oito horas de incubação, para os dois solos estudados, fato que pode ser verificado, multiplicando-se o valor da atividade enzimática pelo número de horas de incubação. Considerando

a velocidade de hidrólise da uréia, observou-se uma nítida tendência de diminuição nos diferentes tempos de incubação dos solos estudados.

No caso do Latossolo Vermelho Aluminoférrico típico, a queda da velocidade ocorreu do tempo 1 para o 8, e, após 8 horas de incubação, houve perda de, aproximadamente, 30 % na velocidade, comparada ao tempo de incubação de 1 h. Assim sendo, 4 h de incubação, utilizadas no método de May & Douglas (1976), acarretaram uma perda de atividade em torno de 18 %.

No Latossolo Vermelho distrófico típico, verificou-se que, nas primeiras 3 h, a queda na velocidade foi mais acentuada, estabilizando-se a partir de então. Nas primeiras 4 h, a queda na atividade já tinha atingido praticamente os 33 % observados após 8 h de incubação.

Portanto, quando se pretende ter uma idéia mais próxima possível da velocidade da hidrólise da uréia no solo ou comparar solos diferentes, é preciso tomar cuidado com o tempo de incubação, aconselhando-se tomar o menor tempo possível que permita detectar a produção de N-NH₄⁺. Para determinações da velocidade da hidrólise da uréia nos solos estudados, sugere-se utilizar um período de uma hora de incubação.

Temperatura de incubação

Analisando o efeito da temperatura de incubação, observou-se que, tanto para o Latossolo Vermelho Aluminoférrico típico quanto para o Latossolo Vermelho distrófico típico, a velocidade de hidrólise da uréia aumentou significativamente dos 5 aos

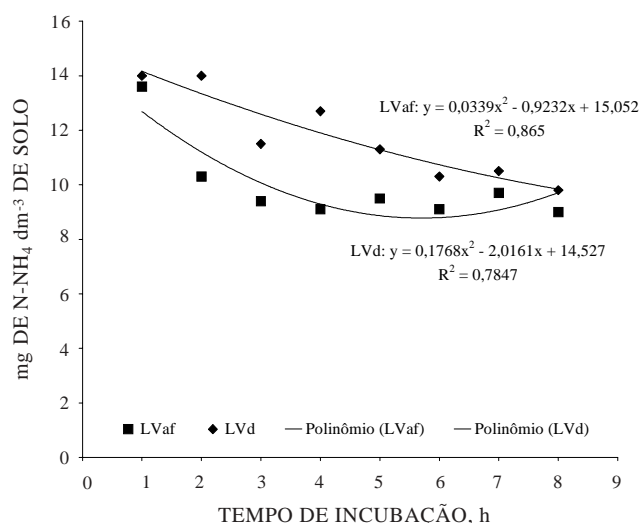


Figura 2. Efeito do tempo de incubação sobre a velocidade de hidrólise da uréia (mg de N-NH₄ dm⁻³ de solo), em amostras de Latossolo Vermelho Aluminoférrico típico e Latossolo Vermelho distrófico típico.

50 °C (Figura 3). Zantua & Bremner (1977) observaram que a atividade da urease aumentou significativamente com um aumento de temperatura de 40 a 70 °C, mas houve um decréscimo rápido de 70–80 °C.

Para ambos, os aumentos iniciais de temperatura levaram a um aumento na velocidade de hidrólise, até um ponto em que novos aumentos passaram a ter efeitos negativos. Para o Latossolo Vermelho Aluminoférrico típico, a máxima velocidade foi obtida com a temperatura de 60 °C, enquanto, para o Latossolo Vermelho distrófico típico, isto ocorreu a uma temperatura de 50 °C. A 25 °C, temperatura média do solo a 10 cm de profundidade, no município de Jaboticabal (Melo, 1974), a atividade da urease representou 14,4 % da atividade a 60 °C. A 37 °C, temperatura sugerida por May & Douglas (1976), a atividade obtida representou 35 % da atividade máxima (60 °C).

Como o interessante é avaliar o papel que a urease desempenha no ciclo do nitrogênio, é importante que o ensaio seja realizado na temperatura do solo, não obstante isso possa representar apenas uma percentagem da atividade máxima possível. Indica-se, assim, para as condições apresentadas, o uso da temperatura de incubação de 30 °C.

pH

A velocidade de hidrólise da uréia (Figura 4), tanto para as amostras de LVaf como para as de LVd, aumentou significativamente do pH 2,2 até o pH 8,0 ($F = 74,5^{**}$ e $35,5^{**}$, respectivamente). Em pH 5,2, próximo ao observado em grande número de solos tropicais, a atividade da urease situou-se na faixa de 42–44 % da atividade máxima encontrada (pH 8,0).

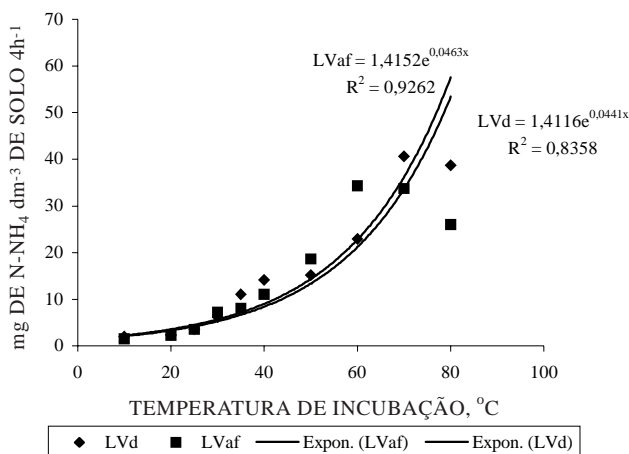


Figura 3. Velocidade de hidrólise da uréia (mg de N-NH₄ dm⁻³ de solo 4 h⁻¹), sob diferentes temperaturas de incubação, em amostras de Latossolo Vermelho Aluminoférrico típico e Latossolo Vermelho distrófico típico.

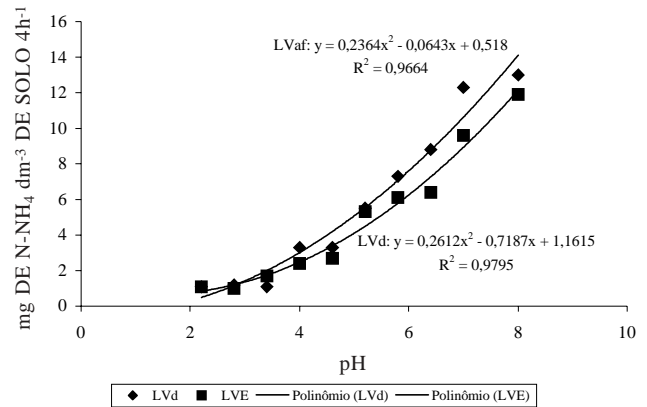


Figura 4. Velocidade de hidrólise da uréia (mg de N-NH₄ dm⁻³ de solo 4 h⁻¹), sob influência do pH, em amostras de Latossolo Vermelho Aluminoférrico típico e Latossolo Vermelho distrófico típico.

Embora vários estudos sobre os efeitos de diferentes pH sobre a atividade da urease tenham sido realizados, os resultados observados foram muito divergentes. Pettit et al. (1976) encontraram, como pH ótimo, valores variando de 6,5 a 7,0, enquanto Tabatabai & Bremner (1972) e May & Douglas (1976) encontraram valores de 8,8 a 9,0. Essas divergências podem ser atribuídas a diferenças nos tampões, tipo de solo e concentração de uréia usada no ensaio.

Assim, para avaliar a participação da urease no ciclo do nitrogênio do solo, é preciso que o pH do meio de incubação esteja próximo ao do pH do solo. Portanto, sugere-se que a incubação das amostras de terra seja feita sem a alteração do pH, ou seja, sem o uso de uma solução tampão.

Concentração do substrato

Os resultados obtidos para a velocidade de hidrólise, sob diferentes concentrações de uréia (0,039–5,0 g L⁻¹) encontram-se na figura 5, apresentando comportamento diferenciado para os dois solos estudados. Para o LVaf, a velocidade máxima obtida foi de 10,42 mg dm⁻³ de N-NH₄⁺ g 4 h⁻¹. Nessa condição, uma concentração de uréia de 3,3 g L⁻¹ foi suficiente para a saturação dos sítios ativos da enzima e obtenção da velocidade máxima inicial. No caso do LVd, a velocidade máxima foi de 14,8 mg dm⁻³ de N-NH₄⁺ g 4 h⁻¹, de tal modo que uma concentração de uréia de 2,5 g L⁻¹ foi suficiente para a saturação dos sítios da enzima.

Estudos sobre a concentração de uréia em testes de atividade da urease mostraram que a velocidade de hidrólise é aumentada com o acréscimo na concentração do substrato até atingir uma quantidade de uréia adicionada suficiente para saturar a enzima (Zantua & Bremner, 1977). Os resultados obtidos por Santos et al. (1991) mostraram também comportamento diferenciado

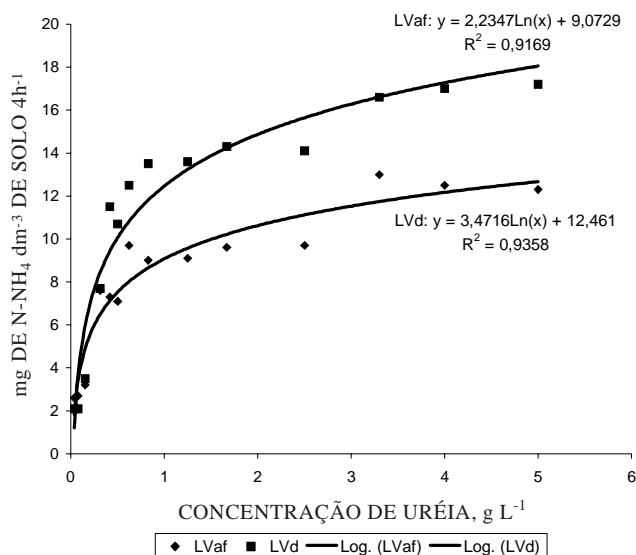


Figura 5. Velocidade de hidrólise da uréia (mg de N-NH₄ dm⁻³ de solo 4 h⁻¹) sob diferentes concentrações de substrato, em amostras de Latossolo Vermelho Aluminoférrico típico e Latossolo Vermelho distrófico típico.

entre os solos, tendo o Latossolo Roxo sob vegetação de mata apresentado maior velocidade de hidrólise, enquanto o Latossolo Roxo sob o cultivo de pinus e o Latossolo Vermelho-Amarelo apresentaram as menores.

CONCLUSÕES

1. As melhores condições de armazenamento das amostras de solo utilizadas na determinação da velocidade de hidrólise da uréia ocorreram em temperatura ambiente ou 5 °C, após secagem ao ar, por um período de até 7 dias.

2. Para as condições estudadas, o melhor tempo de incubação foi de uma hora a 25–30 °C, sem a utilização de tampão para acertar o pH.

3. A concentração de uréia suficiente para soterrar os sítios da enzima foi de 3,30 g L⁻¹, para o Latossolo Vermelho Aluminoférrico típico, e de 2,5 g L⁻¹, para o Latossolo Vermelho distrófico típico.

LITERATURA CITADA

ARUNACHALAN, A. & MELKANIA, N.P. Influence of soil properties on microbial populations, activity and biomass in humid subtropical mountains ecosystems of India. *Soil Bio. Biochem.*, 30:217-223, 1999.

BENINI, S.; RYPNIEWSKI, W.R.; WILSON, K.S.; MILLETI, S.; CIURLI, S. & MORGANI, S. A new proposal for urease mechanism based on the crystal structures of native and inhibited enzyme from *Bassillus pasteurii*: why urea hydrolysis costs two nickels. *Struct. Fold. Design*, 7:205-216, 1999.

BREMNER, J.M. & KEENEY, D.R. Steam distillation methods for determination of ammonium, nitrate and nitrite. *Anal. Chim. Acta*, 32:485-495, 1965.

BREMNER, J.M. & MULVANEY, R.L. Urease activity in soil. In: *Soil enzymes*. 1978. p.149.

CONRAD, J.P. Catalytic activity causing the hydrolysis of urea in soil as influenced by several agronomic factors. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 5:238-241, 1940a.

CONRAD, J.P. The nature of the catalyst causing the hydrolysis of urea in soils. *Soil Sci.*, 50:119-134, 1940b.

CONRAD, J.P. The occurrence and origin of urease like activities in soil. *Soil Sci.*, 54:357-380, 1942a.

CONRAD, J.P. Enzymatic vs. microbial concepts of urea hydrolysis in soils. *J. Agron.*, 34:1102-1113, 1942b.

CONRAD, J.P. Some effects of developing alkalinities and other factors upon urease like in soils. *Soil Sci. Am. Proc.*, 5:171-174, 1943.

DALAL, R.C. Urease activity in some Trinidad soils. *Soil Biol. Biochem.*, 7:5-8, 1975.

DOUGLAS, L.A. & BREMNER, J.M. A rapid method of evaluating different compounds as inhibitors of urease activity in soils. *Soil Biol. Biochem.*, 3:309-315, 1971.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos, Rio de Janeiro. Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. Brasília, Embrapa produção de Informação; Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 1999. 412p.

GOULD, W.D.; COOK, F.D. & WEBSTER, R.G. Factors affecting urea hydrolysis in several Alberta soils. *Plant Soil*, 38:393-401, 1973.

KLOSE, S. & TABATABAI, M.A. Urease activity of microbial biomass in soils. *Soil Biol. Biochem.*, 31:205-211, 1999.

LONGO, R.M.; MELO, W.J.; PAVAN, S.A.; CHELLI, R.A. & LEITE, S.A.S. Efeito da secagem, tempo e condições de armazenamento, concentração de uréia, temperatura, pH e tempo de incubação na atividade da urease em dois solos do Estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 13., Porto Alegre, 1991. Porto Alegre, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1991. p.206.

MARGESIN, R.; ZIMMERBAUER, A. & SCHINNER, F. Monitoring of bioremediation by soil biological activities. *Chemosphere*, 40:339-346, 2000.

MAY, P.B. & DOUGLAS, L.A. Assay for soil urease activity. *Plant Soil*, 45:301-305, 1976.

MELO, W.J. Variação do N-amoniaco e N-nitrico em um Latossolo Roxo cultivado com milho (*Zea mays* L.) e com Lablab (*Dolichos lablab*), Piracicaba, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 1974. 104p. (Tese de Doutorado)

- PETTIT, N.M.; SNITH, A.R.J.; FREEDMAN, R.B. & BURNS, R.G. Urease: activity, stability and kinetic properties. *Soil Biol. Biochem.*, 8:479-484, 1976.
- ROTINI, O. T. La transformazioni enzimatica dell-urea nell terreno. *Ann. Labor. Ric. Ferm.*, 3:134-154, 1935.
- SANTOS, A.R.; VALE, F.R. & SANTOS, J.A.G. Avaliação de parâmetros cinéticos da hidrólise da uréia em solos do sul de Minas Gerais. *R. Bras. Ci. Solo*, 15:309-313, 1991.
- SILVA, T.; MELO, W.J.; TEIXEIRA, S.T.; LEITE, S.A.S. & CHELI, R.A. Efeito do lodo de esgoto contaminado com doses crescente de cromo sobre a atividade enzimática do solo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 15., Viçosa, 1995. Anais. Viçosa, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1995. p.2325-2330.
- SPEIR T.W.; LEE, R.; PANSIER, E.A. & CAIRNS, A. A comparison of sulfatase, urease and protease activities in planted and in fallow soils. *Soil Biol. Biochem.*, 12:281-291, 1980.
- TABATABAI, M.A. & BREMNER, J.M. Assay of urease activity in soils. *Soil Biol. Biochem.*, 5:479-487, 1972.
- TAYLOR, J.P.; WILSON, B.; MILLS, M.S. & BURNS, R.G. Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and sub soils using various techniques. *Soil Biol. Biochem.*, 34:387-401, 2002.
- ZANTUA, M.I. & BREMNER, J.M. Stability of urease in soils. *Soil Biol. Biochem.*, 9:135-140, 1977.