

A ENZIMA UREASE E SUAS APLICAÇÕES NA AGRICULTURA E ENGENHARIA

UREASE ENZYME AND ITS APPLICATION ON THE AGRICULTURE AND ENGINEERING

Vinicius Luiz Pacheco ¹; Luciane Maria Colla²

¹ Mestrando no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e Ambiental-PPGEng-UPF

E-mail: vinimanfroipacheco@gmail.com

² Doutora em Engenharia de Alimentos; Docente PPGEng-UPF

E-mail: lmcolla@upf.br

RESUMO

A urease é uma enzima produzida por bactérias, plantas, fungos, algas e invertebrados; ainda, caracteriza-se por ter função catalítica de hidrolisar a ureia, formando como produto final ácido carbônico e amônia, e por consequência aumenta o pH do meio como efeito reativo da reação. Na ciência, é estudada primordialmente nas áreas da agricultura, medicina e engenharia, com amplas aplicações práticas e variadas formas específicas de monitoramento da atividade ureolítica. O presente artigo faz uma revisão sobre a aplicabilidade da urease na Agricultura e na Engenharia; explanando os microrganismos produtores envolvidos no processo; as propriedades cinéticas da urease; os problemas correlatos com a volatilização da amônia na agricultura e a aplicabilidade da urease por meio da técnica MICP (Microbially Induced Calcite Precipitation) na Engenharia, por meio da biocimentação de solos e a biomineralização ou imobilização de metais tóxicos através da técnica MICP. Logo, foi possível concluir que na agricultura o problema com a volatilização da amônia pode ser controlado através de inibidores como o NBPTU e SuperU, atuando diretamente no controle de emissão de NH₃. Já, na Engenharia, a técnica MICP é eficiente no aperfeiçoamento de propriedades geomecânicas de solos predominantemente arenosos, com o uso de microrganismos nativos de tais solos. Ainda, a biorremediação e encapsulamento de metais tóxicos pela técnica MICP mostra-se eficiente, porém requer aprimoramento de estudos no quesito de monitoramento da lixiviação de metais tóxicos extremamente móveis, como o Cr⁶⁺, durante o processo de aplicação da solução biocimentante.

Palavras-chave: Urease. Agricultura. Engenharia. MICP. Metais tóxicos.

ABSTRACT

Urease is an enzyme produced by bacteria, plants, fungi, algae and invertebrates; and to characterize by its catalytic function of hydrolyzing the urea, forming the carbonic and ammonium as the final product and explaining the pH as a medium as the reactive effect of the reaction. In science, it is studied primarily in the fields of agriculture, medicine and engineering, with broad practical applications and varied specific forms of monitoring ureolytic activity. This article reviews the applicability of urease in Agriculture and Engineering; explaining the producing microorganisms involved in the process; the kinetic properties of urease; the problems related to the volatilization of ammonia in agriculture and the applicability of urease through the MICP (Microbially Induced Calcite Precipitation) technique in Engineering, through the biocimentation of soils and the biomineralization or immobilization of toxic metals through the MICP technique. Therefore, it was possible to conclude that in agriculture the problem with volatilization of ammonia can be controlled through inhibitors such as NBPTU and SuperU, acting directly in the NH₃ emission control. In Engineering, the MICP technique is efficient in improving the geomechanical properties of predominantly sandy soils, with the use of microorganisms native to these soils. Furthermore, the bioremediation and encapsulation of toxic metals by the MICP technique is efficient, however, it requires improvement on studies about the monitoring of leaching of extremely mobile toxic metals, such as Cr⁶⁺, during the application process of the biocement solution.

Keywords: Urease. Agriculture. Engineering. MICP. Heavy metals.

1. INTRODUÇÃO

A urease é uma enzima proteica encontrada na natureza, sendo produzida por bactérias, fungos, plantas, algas e invertebrados, porém não sintetizadas por animais. A urease realiza a catálise da reação de hidrólise da ureia, resultando em amônia e ácido carbônico (KRAJEWSKA, 2009).

A ureia foi isolada da urina humana pela primeira vez em 1773 por Hilaire Rouelle e sintetizada a partir de compostos inorgânicos na sequência em 1828 por Wöhler. Em 1978, Fourcroy e Vauquelin descobriram que a amônia na urina era oriunda da fermentação da ureia, porém apenas em 1864 van Tieghem isolou o primeiro microrganismo ureolítico e em 1874 uma enzima ureolítica foi obtida; sendo posteriormente, em 1890 denominada urease (KRAJEWSKA, 2009).

Em 1926, James B. Sumner cristalizou a urease a partir de sementes de *Canavalia ensiformis* (jackbeans), e demonstrou pela primeira vez a possibilidade de que as enzimas são proteínas e podem ser cristalizadas. Esse trabalho rendeu ao autor um prêmio Nobel em 1946. Já em 1975, Burt Zerner demonstrou que a urease (oriundas das jackbeans) possuem íons de Ni em seu sítio ativo, sendo estes fundamentais para a catálise.

A urease é uma amidohidrolases (HOLM; SANDER, 1997); quanto a estrutura apresenta núcleo duplo de Níquel no centro ativo, com a tarefa de ativação do substrato e da água para as posteriores reações. Ainda, caracteriza-se por ser uma exceção entre os bi nucleares metalohidrolases da superfamília, por ser única a possuir Ni no seu centro ativo (KRAJEWSKA, 2009).

Independentemente da forma de manifestação da urease, em plantas, fungos, animais, bactérias ou invertebrados, estudos apontam para um mesmo ancestral comum, com estrutura similar e funções bioquímicas, antes da divergência dos reinos archaea, procariota e eucariota (HOLM; SANDER, 1997).

A aplicabilidade da urease na ciência e áreas de estudos humanos é vasta, comumente é estudada na agricultura, na medicina e na engenharia, com as suas respectivas especificidades de cada área. Dada a sua abrangência, a urease desempenha um papel vital na questão agrônômica como fertilizante, sendo a urea a mais popular dentre os produtores sintéticos de nitrogênio (BOUWMAN *et al.*, 2002). O processo de hidrólise a ureia resulta na emissão de amônia e na sua consequente volatilização, problema este que contribui para a poluição e degradação de ecossistemas próximos a locais de aplicação (ROCHETTE *et al.*, 2009a). Logo, alternativas com inibidores de urease que visam a mitigação da volatilização da amônia são objetos de estudo no mundo. No Brasil, estudos realizados por Cantarella (2008) com cana de açúcar, buscou alternativas para maximizar a eficiência da relação produção de nitrogênio e ureia, através da incorporação de um inibidor de urease denominado NBPT (tiofosfato de N-n-butil triamida), no qual retarda a hidrólise e contribui para a diminuição da volatilização de amônia (CANTARELLA *et al.*, 2008). Outros estudos com diferentes tipos de inibidores são testados e aperfeiçoados em campos experimentais, em âmbito mundial com diferentes matérias, desde resíduos da criação de suínos até fertilizantes sintéticos (BOUWMAN *et al.*, 2002; ROCHETTE, *et al.*, 2009b).

Outra forma de exploração da urease é através da precipitação de carbonato de cálcio, ou também chamada de Microbially Induced Calcite Precipitation (MICP) ou precipitação passiva, na qual aumenta o pH do sistema através da atividade microbiológica, juntamente com a hidrólise de ureia para a produção de íons de CO_3^{2-} , resultando na precipitação de carbonato de cálcio (CaCO_3), formado pela presença de íons de cálcio (ACHAL; PAN, 2014; QABANY *et al.*, 2012).

A empregabilidade da técnica de biocimentação é justificada pelo avanço infraestrutural e tecnológico, os quais requerem métodos menos agressivos ao meio ambiente com menores índices de poluição, como é o caso da biocimentação, que aumenta a capacidade mecânica de solos sem o emprego do cimento, este por sua vez grande responsável pela emissão de CO_2 na atmosfera durante seu processo de produção. Ainda, a técnica MICP é basicamente aplicada sob as seguintes maneiras: remediação de solos contaminados por metais (LI *et al.*, 2016; ZHU *et al.*, 2016); melhoramento da capacidade de carga de solos (FENG; MONTROYA, 2015; van PAASSEN *et al.*, 2010); novos materiais de construção,

restauração de obras de concreto, sequestro geológico de CO₂, processo de biomineralização. Em suma, em processos geotécnicos, construção civil e na engenharia ambiental (KRAJEWSKA, 2017).

O presente artigo revisa a aplicabilidade da urease na Agricultura e Engenharia, descrevendo suas respectivas funções, propriedades cinéticas, aplicações e métodos de quantificação da atividade ureolítica. O trabalho aborda primordialmente questões atuais relacionadas às enzimas ureolíticas nos campos supracitados, com ênfase para a precipitação de carbonato de cálcio (CaCO₃) em atividades correlatas à Engenharia.

2. MECANISMO DE AÇÃO DA UREASE

O funcionamento de clivagem molecular da ureia ocorre através da catalização enzimática da urease. Na ausência da enzima, a reação é considerada uma reação extremamente lenta, podendo se prolongar por longos períodos, inviabilizando a utilização da mesma na ciência (WOLFENDEN; SNIDER, 2001). As enzimas diminuem o tempo de ativação das reações, tornando reações químicas viáveis, a exemplo do uso da urease na agricultura e engenharia (KRAJEWSKA *et al.*, 2012).

O esquema da Figura 1 apresenta o produto da quebra molecular, através da hidrólise da ureia, em que o processo pode ocorrer de forma catalisada pela urease formando na primeira etapa o ácido carbâmico (H₂N-COOH) e amônia (NH₃), como produto final o ácido carbônico (H₂CO₃) e duas moléculas de amônia (NH₃) (KRAJEWSKA, 2009; SUMNER; HAND, 1931). Ainda, a hidrólise da ureia pode ocorrer de forma não catalisada, onde forma como produto intermediário o cianato (HN=C=O) e amônia (NH₃), e como produto final ácido carbônico (H₂CO₃) e duas moléculas de amônia (NH₃) (KRAJEWSKA, 2009).

A reação da urease, conforme mencionado anteriormente, é lenta, funcionando em meio aquoso e em faixa de atuação de pH variando entre 2 até 12 (ZERNER, 1991). Sua energia de ativação é estimada entre 30-40kcal/mol (PAULING, 1948; WHELAND, 1955). Como o k_{uncat} para a reação não catalisada de hidrólise da ureia é experimentalmente indisponível, estima-se a eficiência da reação superior a 10¹⁴; sendo a relação entre as constantes cinéticas k_{cat}/K_M maior que a taxa de reação de eliminação não catalisada (KARPLUS *et al.*, 1997).

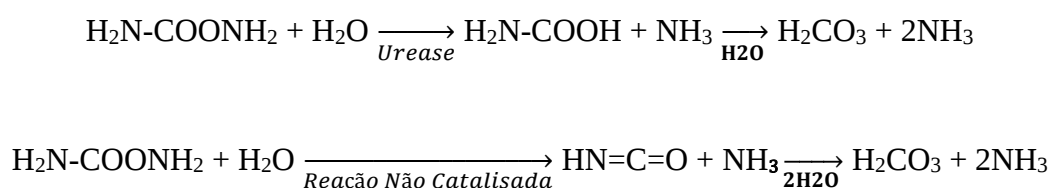


Figura 1 – Reações ureolíticas, com presença enzimática e sem presença enzimática (Krajewska, 2009)

A urease segue o comportamento de Michaelis-Menten, logo a constante K_M , indica a concentração do substrato onde a velocidade da reação é $V_{\text{máx}}/2$. Ainda, a atividade da urease é extremamente dependente do pH, variando na faixa de 4,5-10,5 com picos de atividades máximas na faixa de 7-8 (KRAJEWSKA, 2009). A Tabela 1 apresenta a não variação exacerbada do K_M nas bactérias em relação a alteração ao pH e as propriedades das uréases de algumas plantas e fungos.

Dentre os microrganismos avaliados, o que apresentou K_M mais elevado foi a bactéria *Bacillus pasteurii*, a mais utilizada em processos de biocimentação (seção 3.2). Ainda, observa-se a taxa de

hidrólise do substrato de ureia, sendo esse o substrato mais simples para servir como base de substrato aos microrganismos, outros podem ser utilizados como amido e éster, porém mais complexos são devido a inibição do processo de urease (KRAJEWSKA, 2009).

3. APLICAÇÕES E FORMAS DE MEDIÇÃO DA UREASE

Este artigo visa a aplicação científica da urease, abordando nos tópicos subsequentes nas áreas da Agricultura e Engenharia, com suas respectivas aplicações, problemática e formas de medição utilizadas atualmente nas pesquisas.

3.1. Agricultura

A fertilidade do solo depende de ciclos biogeoquímicos, os quais envolvem microrganismos na produção para o crescimento e desenvolvimento das plantas, sendo as enzimas responsáveis pela catálise de reações biológicas (HASAN, 2000). A urease é responsável pela quebra da molécula da ureia (hidrólise), dessa forma produzindo amônia para o meio, tem-se uma representação do ciclo da urease na Figura 2, integrado com a síntese de glutamina. A ureia serve como fonte de N, sendo a mais utilizada no mundo para determinado fim (ROCHETTE *et al.*, 2009a). Outro fator relevante, por ser de custo baixo e eficiente fonte de N, faz com que os N-fertilizantes componham cerca de 50% do total aplicados no mundo (KRAJEWSKA, 2009).

Com a demanda atual para a sustentabilidade, é importante notar que a os N-fertilizantes exigem uma grande quantidade de energia no seu processo de incorporação ao solo, logo técnicas nas quais façam uso da máxima eficiência dos mesmos são desejadas, em que é um fator complexo perante a questão metabólica das plantas, as quais apresentam comportamentos diferentes com baixos e altos índices de N (XU *et. al*, 2012). Sobre tudo, a rede fluxo de N através da urease deve ser avaliada e entendida para seu melhor aproveitamento na questão da germinação das plantas (POLACCO; HOLLAND, 1993). Ainda, é importante ressaltar que o N, depois do C, é o mais limitante elemento no processo de nutrição das plantas, destacando então a necessidade de estudos voltados para o seu melhor aproveitamento (SIRKO; BRODZIK, 2000).

Em solos, a urease é reproduzida por microrganismos e plantas (MOBLEY; HAUSINGER, 1989; POLACCO, 1977), ou ainda por meio da aplicação direta de enzimas, as quais possuem características de serem rapidamente sorvidas em superfícies de argilas e matéria orgânica (JEAN-MARC; CORINNE, 2015). Àquela oriunda de plantas é mais rapidamente degradada através de enzimas proteolíticas (PETTIT *et al.*, 1976).

Exemplificando os microrganismos produtores de urease no solo, tem-se as bactérias, em que a representatividade da *Bacillus pasteurii* entre os *Bacilli* mostra-se vasta, pois a mesma possui grande capacidade de produção de urease, sendo aplicada não somente na agricultura, mas também em outras áreas, como a engenharia (ACHAL; PAN, 2014; CHRISTIANS; KALTWASSER, 1986).

O principal malefício da aplicação de N-fertilizantes é a volatilização de NH_3 (amônia), na qual a perda de N por tal processo pode atingir faixas que variam de 0% a 50% (SADEGHPOUR *et al.*, 2015; SOMMER *et al.*, 2004). O processo de volatilização é um importante componente para ciclo de vida de N (KESHAVARZ AFSHAR *et al.*, 2018), porém a sua emissão em demasia contribui para o acréscimo dos gases de efeito estufa, para a degradação natural de ecossistemas, poluição, odor e impactos na vida dos seres humanos e de animais (KRAJEWSKA, 2009; ROCHETTE *et al.*, 2009a). Observa-se ainda que a volatilização depende de diversos fatores, como por exemplo o método aplicado e o tipo de ureia utilizada (ROCHETTE *et al.*, 2009a); mas, nota-se que em experimentos realizados no Brasil, a taxa de volatilização reduziu-se no período de inverno, em experimentos realizados por Cantarella (2008).

Tabela 1 – Comparação da propriedade cinética K_M e pH de bactérias, plantas e fungos

Urease	K_M (mM)	pH _{ótimo}	Ref.
Bactérias			
<i>Bacillus pasteurii</i>	17,3	8,0	(BACHMEIER <i>et al.</i> , 2002; KRAJEWSKA, 2009)
<i>Helicobacter pylori</i>	0,2-0,8	8,0-8,2	(GANG <i>et al.</i> , 2009; KRAJEWSKA, 2009)
<i>Arthobacter oxydans</i>	12,5	7,6	(SCHNEIDER <i>et al.</i> , 1984; KRAJEWSKA, 2009)
<i>Klebsiela aerogenes</i>	2,8	7,75	(KRAJEWSKA, 2009; TODD; HAUSINGER, 1987)
Plantas			
<i>Canavalia ensiformis</i> (Jack bean)	2,9-3,6	7,0-7,5	(KRAJEWSKA, 2009; KRAJEWSKA; ZABORSKA, 1999)
<i>Gossypium hirsutum</i> (sementes de algodão)	0,12-0,15	8,0	(KRAJEWSKA, 2009; MENEGASSI <i>et al.</i> , 2008)
Fungos			
<i>Aspergillus nidulans</i>	1,33	8,5	(CREASER; PORTER, 1985; KRAJEWSKA, 2009)
<i>Aspergillus niger</i>	3,0	8,0	(KRAJEWSKA, 2009; SMITH <i>et al.</i> , 1993)
Substrato			
Ureia $H_2N-CO-NHOH$	1-4	-	(KRAJEWSKA, 2009)

Tendo em vista o problema relacionado a volatilização de NH_3 , diversos inibidores estão sendo estudados para minimizar esse efeito. Um deles é o NBPT (tiofosfato de N-n-butil triamida), aplicado sobre a palha de cana-de-açúcar, o qual diminuiu a hidrólise de ureia e auxilia no controle da volatilização de NH_3 sob condições secas e experimentais, com uma taxa de redução que variou entre 15% a 78%, dependendo das condições climáticas (CANTARELLA *et al.*, 2008).

Outro estudo realizado sobre a mesma problemática por Keshavarz Afshar (2018) comparando a aplicação da ureia convencional em relação a SuperU (composto contendo ureia e inibidores de nitrificação), mostrou a redução de 45% da emissão de NH_3 com a utilização do Super U. Tal efeito deu-se pelo atraso do processo inicial de volatilização de NH_3 . O inibidor SuperU também foi eficaz em relação emissão cumulativa de NH_3 , comparada a aplicação convencional de ureia, mas apenas se a incorporação do fertilizante no solo se dá pela sequência de chuva ou incorporação cultural, no qual facilita a interação do SuperU com o solo.

Já para solos com pH ácido, estudos realizados por Rochette *et. al* (2009) mostraram a eficiência na redução de NH_3 através da aplicação do inibidor NBPT, ainda ressaltando variáveis que demandam maior estudos futuros, tais quais a influência do pH inicial do solo, teor de água, saturação da base e a forma de aplicação da ureia em bandas em relação a taxa de volatilização de NH_3 .

De uma forma alternativa, outros inibidores também estão sendo estudados, tais quais a incorporação de resíduos da produção de suínos e formas de aplicação da ureia, como em bandas, no qual tem-se indicativos de que não são tão eficientes em relação a redução da volatilização de NH_3 , quanto a incorporação de ureia (ROCHETTE *et al.*, 2009b).

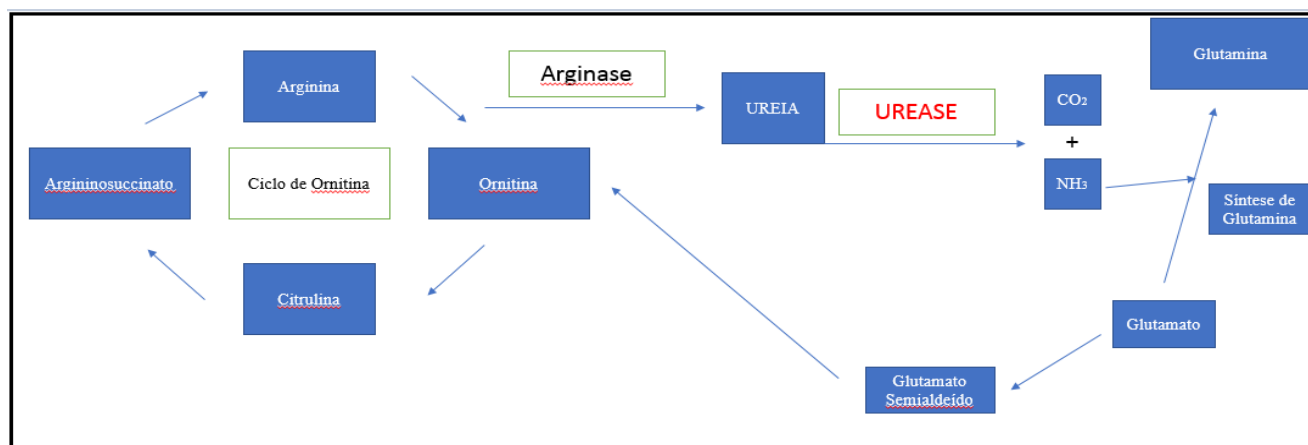


Figura 2 – Metabolismo da ureia em plantas (Adaptado de Sirko; Brodzik 2000)

Em suma, estudos que relacionem as interações entre N e a ureia são a base para o entendimento e otimização das técnicas de fertilização, como demonstra Pinton *et al.* (2016). Ainda, análises metabólicas e preteômicas são essenciais para investigar o processo de absorção de N pelas plantas; bem como novas experimentações com condições reais de cultivo são fundamentais para o dinamismo do ciclo do N na prática, com variáveis reais de campo, dessa forma guiando o avanço científico ao descobrimento das interações de N presentes no solo (PINTON *et al.*, 2016), e em última análise desencadeando o uso eficiente e performático de fertilizantes no solo, nos quais garantam o arranjo harmônico entre produtividade e produção de gases maléficos ao meio ambiente e seus ecossistemas.

3.1.1. Formas de medição da urease na agricultura

A atividade ureolítica no solo pode ser determinada através da taxa de produção de NH_3 (SINSABAUGH *et al.*, 2000; TABATABAI; BREMNER, 1972), pela perda de ureia durante o processo de hidrólise da mesma (ZANTUA; BREMNER, 1975) ou ainda pela produção de CO_2 (GUETTES *et al.*, 2002). Nos estudos citados anteriormente de Cantarella (2008) Rochette *et al.* (2009) e Keshavarz Afshar (2018), a produção de urease foi correlacionada com a volatilização da amônia; sendo essa, medida de diferentes formas, como por exemplo túneis de vento e por câmaras semi-abertas para a captação de NH_3 .

Diante de tais técnicas, a mais utilizada nas pesquisas científicas é àquela pela produção de NH_3 , porém ressalvas devem ser feitas em relação aos resultados obtidos. Como sugeriu Qin (2010) em testes com e sem vedação que a atividade ureolítica é subestimada em uma faixa de erro que varia de 7,38% até 15,97% dependendo do tipo de solo e temperatura, em função da não contabilização que uma certa porcentagem de NH_3 produzida na urease é consumida pelo processo de nitrificação.

Já em relação a técnica de mensuração da atividade ureolítica pela produção de CO_2 , Guettes *et al.* (2002) demonstrou algumas vantagens: detecção de baixos índices de CO_2 e ensaios não destrutivos das amostras. Porém, deve-se o dióxido de carbono oriundo da urease, daquele produzido por outros processos metabólicos, como a respiração do solo; problema esse que pode ser solucionado através da

adição de inibidores como o NBPT, que reduz cerca de 90% a atividade ureolítica. O método mostra-se utilizável, com vantagens como a redução do tempo e mitigação de efeitos contrários como a nitrificação.

Diversas são as variáveis observáveis no processo de mensuração da urease, logo é primordial que todos os fatores sejam considerados, como o caso da nitrificação no processo de volatilização da NH_3 , bem como a obtenção de separação de diferentes fontes produtoras de CO_2 , quando a medição do mesmo é utilizada para quantificar a urease.

3.2. Engenharia

3.2.1. Mecanismo de ação da urease na biocimentação

Na biocimentação, também denominada Microbially Induced Calcite Precipitation (MICP), diferentes tipos de bactérias são utilizados, com as mais comuns sendo *Sporosarcina pasteurii* e *Bacillus pasteurii*, responsáveis pela produção da urease e hidrólise da ureia para formação de calcite (PEDREIRA, 2012). O sítio ativo característico da urease produzida pela bactéria *Bacillus pasteurii* é demonstrado na Figura 3, onde o mesmo possui um centro ativo binuclear de Ni, em que os íons de Ni são ligados por um íon hidróxido (WB), juntamente com duas moléculas de água no terminal, W1 no núcleo Ni(1), W2 no núcleo Ni (2) e W3 localizada em direção da abertura do sítio ativo, é esse aglomerado que o substrato da ureia substitui quando ocorre a ligação do sítio ativo para que a reação ocorra (KRAJEWSKA, 2009); ainda Ni(1) é caracterizado por ter 5 ligações entre os elementos e Ni(2) por ter 6 ligações.

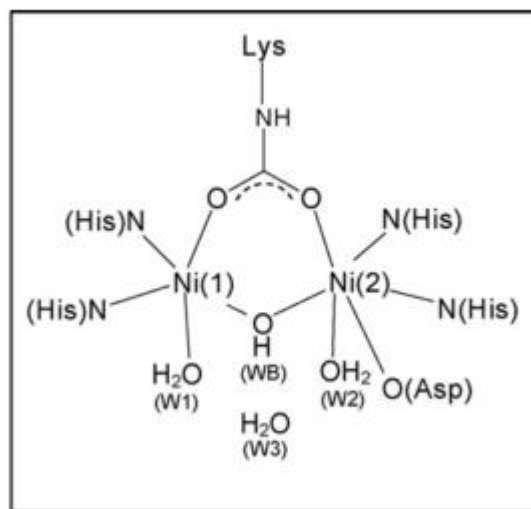
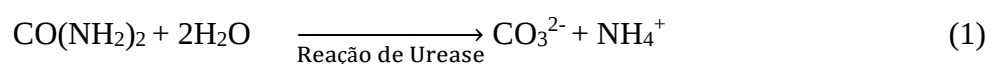


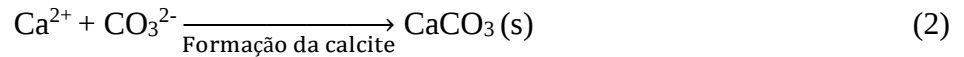
Figura 3 – Sítio ativo típico da urease produzida pela bactéria *Bacillus pasteurii* (Adaptado Krajewska, 2009)

A precipitação de carbonato de cálcio pode ocorrer sob três formas polimórficas: calcite, aragonite e veterite, sendo a forma mais estável a primeira (SIMKISS, 1964). A técnica ainda pode ser induzida por organismos no ciclo do nitrogênio, via amonificação de amino ácidos, redução de nitrato e pela já citada hidrólise de ureia, sendo essa última a técnica mais utilizada (WHIFFIN, 2004). A atividade ureolítica por meio de bactérias é difundida em larga escala e é utilizada na técnica MICP para a produção de calcite (STOCKS-FISCHER *et al.*, 1999).

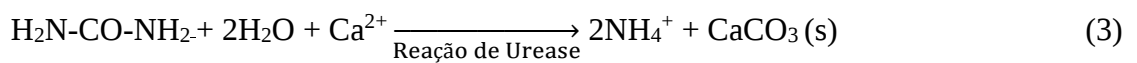
A hidrólise da ureia é uma reação química aonde a enzima ureolítica decompõe a ureia ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) no solo através da Eq. (1) (NG *et al.*, 2012; PEDREIRA, 2012; QABANY *et al.*, 2012):



Após, a amônia (NH_4^+) produzida da hidrólise da ureia é responsável pelo aumento do pH e assim inicia-se a precipitação de carbonato (PEDREIRA, 2012). A precipitação da calcite ocorre pela combinação dos íons (CO_3^{2-}) oriundos da hidrólise da ureia, em concomitância com os íons de cálcio (Ca^{2+}), provindos da solução de cálcio, resultando na Eq. (2) (NG *et al.*, 2012; STOCKS-FISCHER *et al.*, 1999):



O processo de precipitação aproveita-se da hidrólise da ureia, juntamente com a elevação do pH do meio para promover a formação de CaCO_3 através da interação entre os íons de carbonato e os íons de cálcio do meio. A cristalização toma lugar nas paredes celulares das bactérias e servem como cristais nos sítios de nucleação, isso ocorre porque as paredes celulares possuem carga negativa de grupos funcionais e fazem a ligação dos íons de cálcio Ca^{2+} , resultando na decomposição e acumulação, assim podendo ser traduzida pela Eq. (3) o processo sumarizado (KRAJEWSKA, 2017):



A precipitação de carbonato de cálcio através da técnica MICP tem se mostrado um eficiente método para a produção em largas quantidade de CaCO_3 , sendo suas aplicações das mais variadas possíveis, que será abordado em seção específica desse artigo (DHAMI *et al.*, 2013; PHILLIPS *et al.*, 2013; ZOHEIR *et al.*, 2013)

Esta seção do artigo é dedicada ao estudo aplicado da técnica de indução de carbonato de cálcio, também conhecida como Microbially Induced Calcite Precipitation (MICP), na qual é uma técnica de biocimentação oriunda da atividade enzimática da urease. A abordagem é dividida em três partes básicas: urease em solos através da biocimentação-aperfeiçoamento de propriedades mecânicas e biorremediação; aplicabilidades diversas da urease como forma de biocimentação na engenharia; formas de medição da urease em solos submetidos a biocimentação.

3.2.2. Urease em solos através da biocimentação-aperfeiçoamento de propriedade mecânicas e biorremediação

A técnica MICP é uma atividade controlada precipitação de carbonato de cálcio, a qual pode ser realizada de duas formas básicas: biologicamente controlada e biologicamente induzida, ambas com o intuito da precipitação de CaCO_3 (MUJAH *et al.*, 2017). Na mineralização biologicamente controlada, os organismos controlam a nucleação e o processo de crescimento das partículas minerais, sintetizando assim minerais específicos de acordo com as espécies dos organismos envolvidos; já na mineralização biologicamente induzida, o processo é dependente das condições ambientais, alterando assim o tipo de minerais produzidos, uma vez que esse depende de diversos fatores, como: concentração de solução biocimentante, microrganismos envolvidos, condições ambientais, temperatura, pH do meio, entre outros (BARABESI *et al.*, 2007; MUJAH *et al.*, 2017). Na engenharia, a bactéria mais utilizada, na qual tem apresentado resultados importantes tanto na área de melhoramento de capacidade de solos como biorremediação é a *Bacillus pasteurii* ou *Sporosarcina pasteurii* (ACHAL; PAN, 2014; CHRISTIANS; KALTWASSER, 1986; CIURLI *et al.*, 1996; STOCKS-FISCHER *et al.*, 1999; WHIFFIN, 2004; ZHU *et al.*, 2016).

Para o devido estímulo dos microrganismos, uma solução de nutrientes é inserida ao meio. Esta, requer uma larga variedade de nutrientes, sendo os macronutrientes oriundos de uma suplementação de fonte natural, como o resíduo de biomassa, enquanto os micronutrientes são supridos por elementos contidos na água (AL-SALLOUM *et al.*, 2017). Para aplicação da solução na técnica MICP, diversas variações de composição de solução foram estudadas, e possuem influência no resultado final

principalmente àquelas que otimizam a concentração de ureia e fonte de cálcio, juntamente com a proporção adequada de microrganismos, para que a reação da urease obtenha uma taxa máxima de atividade e por resultado produza adequadamente CaCO_3 . A composição da solução para o processo de biocimentação é formada basicamente pelos seguintes elementos: extrato de levedura, cloreto de amônia (NH_4Cl), peptona, extrato de carne, bicarbonato de sódio, ureia ($(\text{NH}_2)_2\text{CO}$) e cloreto de cálcio (CaCl_2), sob diferentes tipos de combinações de concentrações (ACHAL *et al.*, 2009; ACHAL; PAN, 2014; van PAASSEN *et al.*, 2010; STOCKS-FISCHER *et al.*, 1999). O processo de clivagem requer uma fonte de cálcio adequada deve ser utilizada, preferencialmente cloreto de cálcio, para que se obtenha uma eficácia considerável na formação de CaCO_3 , de acordo com Achal (2014). O preenchimento dos vazios pelo produto final da urease (calcite) é demonstrado na Figura 4, dependendo desse processo dos vários fatores citados anteriormente em que culminam na formação de diferentes tipos de cristais de CaCO_3 .

Outro fator crucial no processo de biocimentação é a forma de aplicação da solução e dos microrganismos no solo (caso haja o processo de bioaumentação, pois existe a possibilidade de estimulação dos microrganismos naturais do solo) para a retenção da bactéria ureolítica na matriz do solo, na qual induzirá a precipitação de CaCO_3 (MUJAH *et al.*, 2017). Os métodos mais usuais de biocimentação no solo são: método da injeção ou pelo método da pré-mistura.

O método da injeção é o mais usual no tratamento da biocimentação em solos devido ao fato de controle de variáveis como a pressão, temperatura, gradiente hidráulico e fluxo da solução, além de permitir condições saturadas ou não saturadas dos corpos de prova, procedimento esse denominado de “BioGrout” *in situ*, por avaliar os parâmetros do solo como coesão e rigidez, e a partir dos pressupostos aplicar a técnica de tratamento no local. Experimento realizado por Harkes *et al.* (2010) sugeriu a aplicação do processo de biocimentação em duas etapas, sendo elas: suspensão das bactérias injetadas no solo (arenoso), seguindo imediatamente pela fixação do fluído (solução com alta taxa de salinidade); evitando assim entupimentos durante o procedimento e disposição homogênea do tratamento. Ainda, outros experimentos realizados por Gomez *et al.* (2016), van Paassen *et al.* (2010) e Whiffin *et al.* (2007) fizeram uso da injeção da solução através de bombas para corpos de prova em escalas aumentadas e com profundidades variadas, obtendo graus de biocimentação adequadas e qualificando a técnica de injeção sob pressão controlada. O método de injeção ainda pode ser efetuado através da percolação simples, ou seja sem pressão e outros parâmetros controlados, apenas o gradiente hidráulico, trazendo benefícios como a não necessidade de maquinários pesados para a implementação, além da homogeneidade da distribuição de CaCO_3 no solo devido a percolação da solução por caminhos preferenciais naturalmente atribuídos na formação do solo, porém tal técnica encontra ressalvas em relação a aplicação em solos com permeabilidades reduzidas, devido à dificuldade de percolação da solução (CHENG; CORD-RUWISCH, 2014; MUJAH *et al.*, 2017).

Outrossim, existe o método da pré-mistura, no qual as bactérias são pré-misturadas com o solo, promovendo assim uma homogeneidade pré-determinada. Esse método foi estudado por Yasuhara *et al.* (2012) e apresentou resultado com alto índice de homogeneidade e precipitação de CaCO_3 , porém não demonstrou resultados mecânicos excelentes, quando submetido ao teste de compressão simples (do inglês: Unconfined Compression Test-UCS), em comparação com resultados obtidos para os mesmos testes na literatura (LI *et al.*, 2015; MUJAH *et al.*, 2017). Ressalta-se ainda que essa técnica de pré-mistura não caracteriza um tratamento *in situ*, e sim *ex situ* pois a mesma necessitada retirada do solo de seu estado natural e submetido a uma série de preparativos de pré-mistura.

Ainda, um terceiro viés de aplicação de solução biocimentante foi experimentado por Li *et al.* (2015), onde os espécimes de solo arenoso foram submetidos a tanque reator composto pela solução biocimentante, as bactérias e os incrementos mecânicos necessários para promover oxigênio ao meio e consequente reação da urease. Tal experimento também se caracteriza por ser *ex situ*, uma vez que necessariamente precisa moldar corpos de prova com dimensões desejadas para o emprego da técnica. Nota-se ainda que essa técnica de biocimentação pode ser promissora na área de biomateriais oriundos

da biocimentação, uma vez que é possível planejar experimentalmente as características desejadas e dimensões dos corpos de prova, controlando variáveis importantes no processo de biocimentação, como a concentração das bactérias e da solução.

O tratamento de biocimentação através da reação de urease traz benefícios mecânicos para os solos tratados, como pode ser observado visualmente na Figura 5; tais quais a redução da permeabilidade dos solos tratados, devido ao processo de ligação da calcite com os grãos de solo (Figura 4), por isso solos indicados a tais tratamentos são àqueles com maiores índices de permeabilidade, além disso a permeabilidade é reduzida, mas continua existente após o tratamento, ao passo que aumenta a resistência mecânica do solo (van PAASSEN *et al.*, 2010; YASUHARA *et al.*, 2012). Além da permeabilidade, propriedades geomecânicas são aperfeiçoadas como a rigidez, resistência ao cisalhamento, aumento da capacidade de carga, diminuição da erodibilidade de solos e controle de piping (FENG; MONTOYA, 2015; NG *et al.*, 2012; SALIFU *et al.*, 2016; WHIFFIN, 2004). Um comparativo sobre os tratamentos e os resultados mecânicos obtidos através da biocimentação é observado na Tabela 2.

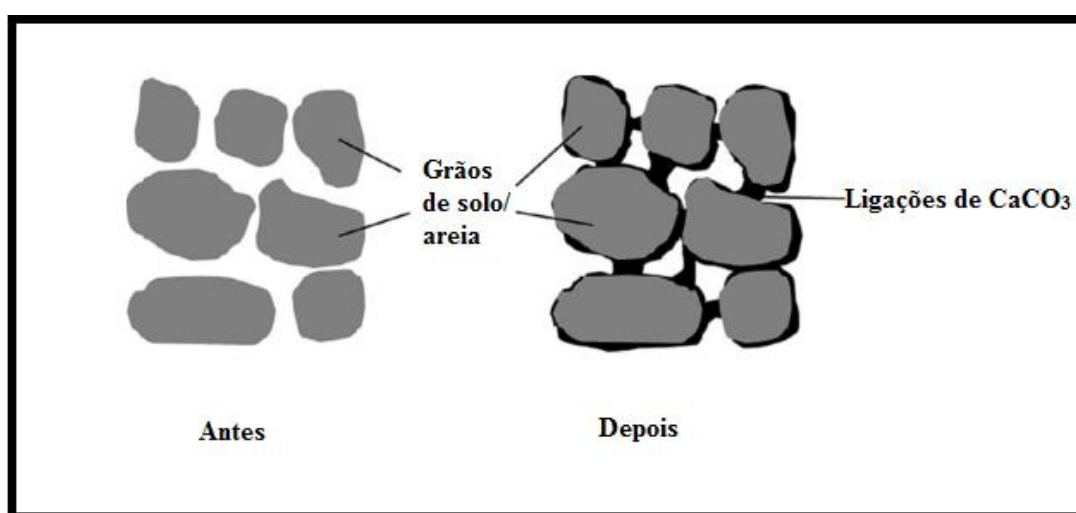


Figura 4 – Representação esquemática da precipitação de CaCO_3 em solo arenoso (Adaptado de Krajewska 2017)

Ainda sobre a questão de tratamento de solos, o processo de biocimentação é aplicado em pequenas escalas, bem como em escalas aumentadas. Em escalas aumentadas, estudo proposto por Gomez *et al.* (2017) avaliam que a técnica de estimulação de microrganismos nativos atinge graus de cimentação semelhantes aos solos submetidos ao processo de bioaumentação (injeção de bactérias no solo). Logo a micro e macro escala devem ser estudadas visando essa estimulação também, não apenas experimentos de bioaumentação, uma vez que o estímulo de microrganismos nativos é mais viável e econômico.

Uma análise da Tabela 2 permite concluir que as melhores resistências a compressão (pelo ensaio UCS), foram registradas com otimizações de concentração molar de solução biocimentante (Ureia e Cloreto de Cálcio) através do método da injeção, seja por percolação ou por fluxo controlado. Ainda, nota-se que estudos não foram conduzidos para otimizar a concentração máxima das bactérias em relação a produção de CaCO_3 , bem como misturas de tipos de bactérias não foram experimentados para propriedades mecânicas do solo. Com estudo de Gomez *et al.* (2017) conclui-se que a aplicação em larga escala da técnica de biocimentação é viável e sobretudo, microrganismos nativos do solo tendem a dar respostas suficientes para a técnica de biocimentação.

Sob a perspectiva da biorremediação, a técnica MICP está sendo utilizada na contenção de metais tóxicos como Cd^{2+} , Ni^{2+} , As e Pb^{2+} (ACHAL *et al.*, 2012; COSTAGLIOLA *et al.* 2007; KANG *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2016; MWANDIRA *et al.*, 2017; PAN *et al.*, 2016). O funcionamento da biorremediação se dá pela redução da biodisponibilidade através da imobilização dos metais durante a

precipitação de calcite, como por exemplo no estudo dirigido por Achal *et al.* (2016), íons de Ni^{2+} próximos aos íons de Ca^{2+} foram incorporados a CaCO_3 , resultando na imobilização do metal através de transformação mineralógica das bactérias utilizadas para a produção da urease.

A larga variabilidade de bactérias produtoras da urease e os diferentes metais biorremediados pela técnica MICP, demonstram uma área em potencial para a imobilização de metais *in situ*, conforme demonstrado na Tabela 3. Ainda, metais normalmente são inibidores da atividade ureolítica, logo estudos são dirigidos em relação a otimização da produção bacteriana variando concentrações ótimas de metais e misturas de bactérias, para uma melhor performance (KANG *et al.*, 2016).

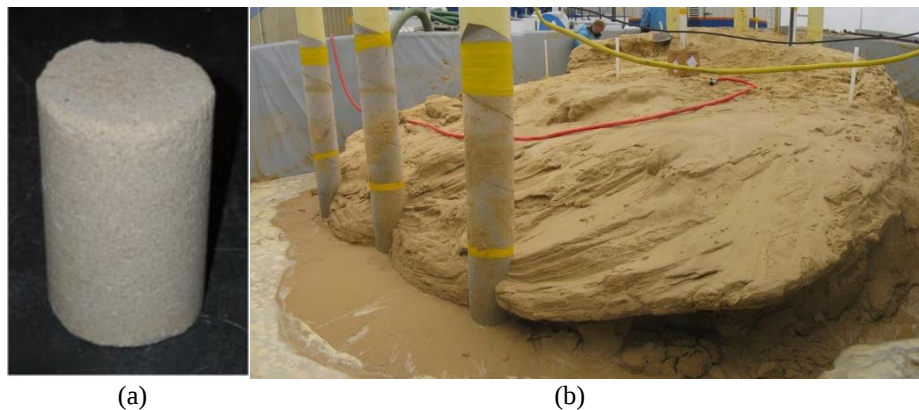


Figura 5 – a) Solo arenoso biocimentado em escalada reduzida, com 100mm de altura e 50mm de diâmetro (Adaptado de YASUHARA *et al.* 2012); b) Aplicação em larga escala da técnica de biocimentação em solo arenoso, experimento com 100m³ (Adaptada de van PAASSEN 2009)

3.2.3. Urease em aplicações diversas na engenharia

Outras formas de aplicação da biocimentação estão relacionadas a autocura do concreto e argamassa, uma vez que esses materiais são os mais utilizados no meio da construção civil. A técnica MICP aliada a esses materiais usa o sistema microbiano, no qual pode ficar inoculado ao meio por longos períodos para reproduzir autocura de fissuras, sem intervenções externas, aumentando assim a durabilidade dos materiais (JOSHI *et al.*, 2017).

Além disso, uma forma alternativa de sequestro de CO_2 da atmosfera, buscando a diminuição do poluente no meio, é a captura do dióxido de carbono e seu consequente armazenamento geológico, no qual vem sendo estudado em solos arenosos aliado a capacidade de bactérias, como a *Sporosarcina pasteurii*, de produzir biocimento e armazenar o poluente, mitigando assim o vazamento do mesmo (KRAJEWSKA, 2017; PHILLIPS *et al.*, 2013).

A aplicabilidade da técnica de biocimentação é vasta, conforme demonstrada nos itens do artigo e tende a ser um meio promissor justamente por mitigar efeitos ambientais em diferentes áreas da engenharia, conforme explicadas no artigo.

3.2.4. Formas de medição da urease na engenharia-biocimentação

A atividade ureolítica na biocimentação pode ser monitorada de duas formas distintas, sendo elas: ensaios qualitativos ou ensaios quantitativos. Os primeiros, normalmente servem para a identificação da ocorrência da urease através do método UAB (do inglês: Christensen's Urea Agar Base), no qual através da coloração dos espécimens, indica a ocorrência da urease, indicando atividade na coloração rosa, como indicado na Figura 6.

Já os ensaios quantitativos mais usuais para a verificação da atividade ureolítica costumam ser realizados de três formas: monitoramento da condutividade elétrica, medição direta de ureia ou pela produção da amônia no processo de biocimentação. Uma comparação dos principais estudos e formas de avaliação da atividade ureolítica é observado na Tabela 4.

Tabela 2 – Resumo dos principais estudos em biocimentação para aperfeiçoamento de propriedades mecânicas do solo

Método de tratamento	Tipo de solo	Bactéria	Bioaumentação	Ureia (Molaridade)	Fonte de Cálcio (Molaridade)	Ensaio	Propriedades geotécnicas	Ref.
Injeção através de bombas/percolação com fluxo controlado.	Arenoso, granulado de fina para média, $d_{50}=0.166$ mm.	<i>Sporosarcina pasteurii</i>	Sim.	Ureia com molaridade de: 1 mol L ⁻¹ .	Cloreto de Cálcio (CaCl ₂) com molaridade de: 1 mol L ⁻¹ .	-Avaliação da velocidade de onda cisalhante (V_s); -UCS (Testes de compressão simples); -Correlações para módulos de elasticidade (E).	- $V_{smédio} = 395\text{ms}^{-1}$, na camada superficial aos 16 dias de tratamento; -UCS máx.= 12,4 MPa; - $E_{50-8,500\text{MPa}}$; - $E_{ur}= 13,500\text{MPa}$;	(HARKES <i>et al.</i> , 2010)
Injeção através de bombas/percolação com fluxo controlado.	Solo composto com areia e argila, variando $0,02 < d_{50} < 1,34$.	<i>Sporosarcina pasteurii</i>	Tratamentos com bioaumentação de $3,5 \times 10^7$ (cells/ml) e com estimulação de microrganismos nativos <i>in situ</i> .	Ureia com molaridade de 0,35 (mM).	Cloreto de Cálcio (CaCl ₂) com molaridade de: 0,25 (mM).	-Ensaio de Penetração do Cone (CPT) (q_c); -Avaliação da velocidade de onda cisalhante (V_s); _Quantificação de calcite.	- $V_{smáx.} = 1,028\text{ms}^{-1}$, sem bioaumentação; - $V_{smáx.} = 967\text{ms}^{-1}$, com bioaumentação; - $q_{cmáx.}$ estimulado= 11,4MPa; - $q_{cmáx.}$ bioaumentado= 16MPa; -Calcite= >5,2% para ambos tratamentos.	(GOMEZ <i>et al.</i> , 2017)
Enzimas pré-misturadas com a areia e após injeção da solução de Cloreto de Cálcio (CaCl ₂) e Ureia.	Areia de Toyoura com diâmetro médio de 0,20mm.	Sem bactérias; uso de enzimas ureolíticas.	Enzimas ureolíticas em quantidades de 0,5 e 1 (g/100 ml de solução).	Ureia variando concentração entre 0,5 e 1 (mol/L).	Cloreto de Cálcio (CaCl ₂) variando concentração entre 0,5 e 1 (mol/L).	-UCS; -Permeabilidade.	-400kPa<UCS<1,6MPa; -Condutividade hidráulica inicial de 0,04 cm/s reduzida na faixa de 60 a 70%.	(YASUHARA <i>et al.</i> , 2012; ZHANG <i>et al.</i> , 2013)
Pré-mistra, na ordem: bactérias + solo + solução cimentante.	Dois solos utilizados, solo 1 com 47,1% de areia e o solo 2 com 17,48%, restantes de sílica e argila.	<i>Bacillus pasteurii</i>	Tratamentos com bioaumentação, variando a concentração entre 1×10^5 , 1×10^6 e 1×10^7 cfu/ml.	Ureia com variação de 0,25; 0,5; 0,75 e 1M.	Cloreto de cálcio (CaCl ₂) com variação de 0,25; 0,5; 0,75 e 1M.	-UCS.	-UCS solo 1: 3,72MPa para 0,5M de concentração da solução e 7 dias de cura; -UCS solo 2: 2,24MPa para 0,5M de concentração da solução e 7 dias de cura.	(SHARMA, 2016)
Injeção através de percolação com o fluxo controlado.	Solo arenoso, $d_{50}=0,15$ mm.	<i>Sporosarcina pasteurii</i>	Sim. Variando OD ₆₀₀ de 0 até 2.	Ureia, variando entre: 0,5; 1; 1,5; 2 e 2,5 (mol/L).	Cloreto de Cálcio (CaCl ₂), variando entre: 0,5; 1; 1,5; 2 e 2,5 (mol/L).	-UCS; -XRD; -SEM; -%CaCO ₃ .	-UCS _{máx} = 18MPa para a maior concentração da solução; -Decréscimo na permeabilidade de $2,17 \times 10^{-5}$ para $9,22 \times 10^{-6}$ ao passo que se aumentou a concentração da solução de 1,5 para 2,5 mol/L; -Formação de cristais hexaédricos rômicos.	(DUO <i>et al.</i> , 2018)

Tabela 3 – Resumo dos principais estudos de biorremediação através da biocimentação

Bactéria	Metal/Características	Meio	Teste	Resultados	Ref.
<i>Sporosarcina ginsengisoli</i>	Metal: As; Crescimento bacteriano sob alta concentração (50mM) de As.	Solo granular.	ATR-FTIR e XRD.	Redução de 66% da concentração inicial de As. Formação de diversos minerais: calcite, vaterite, aragonite e gwihabaite [(NH ₄ K)NO ₃].	(ACHAL <i>et al.</i> , 2012)
<i>Kocuria flava</i>	Metal: Pb; Crescimento bacteriano sob alta concentração (50mM) de Pb.	Solo granular.	Monitoramento da atividade ureolítica e XRD.	Crescimento da atividade ureolítica na presença de Pb pelo período de 7 dias; Identificação da formação de PbCO ₃ , além de calcite e gwihabaite [(NH ₄ K)NO ₃].	(ACHAL <i>et al.</i> , 2012)
<i>Lysinibacillus sphaericus CH-5</i>	Metal: Cd.	Areia siliciosa.	Monitoramento da atividade ureolítica, SEM e XRD.	Taxa máxima de produção de urease de: 2,49µmol/min; Correlação entre a atividade ureolítica e produção de calcite, sendo proporcionais; Remoção de 99,95% de Cd na taxa de 2g/L em 48hrs; Análises através do XRD mostraram a formação de carbonatos de Cd.	(KANG <i>et al.</i> , 2014)
<i>Viridibacillus arenosi B-21</i> , <i>Sporosarcina soli B-22</i> , <i>Enterobacter cloacae KJ-46</i> e <i>E. cloacae KJ-47</i>	Metais: Pb, Cd e Cu; Mistura de bactérias para a remoção dos metais.	Areia siliciosa.	Densidade ótica, pH, atividade ureolítica, produção de calcite e tolerância dos metais.	Máxima produção de urease na KJ-47: 17,6 mg/L; Potencial de remoção dos metais entre 5,56% a 98,25% em 48hrs, sendo: -98,3% de Pb; -85,4% de Cd; -5,6% de Cu.	(KANG <i>et al.</i> , 2016)
<i>Pararhodobacter sp.</i>	Metal: Pb; Remoção completa de 1036 mg/L de Pb.	Solo Arenoso.	SEM, XRD e UCS (testes de compressão simples).	SEM e XRD comprovaram a transformação dos íons de Pb ²⁺ em uma forma mais estável do elemento bioprecipitado; Ensaio de Resistência a compressão simples (UCS) atingiram patamares entre 1,33 a 2,87 MPa, variando a composição de solo granular.	(MWANDIRA <i>et al.</i> , 2017)

Logo, percebe-se que os diferentes métodos podem ser utilizados sob diferentes aplicações e perspectivas de resultados. Ainda quando se é utilizado o monitoramento através da condutividade elétrica é interessante que se faça uma curva de calibração de acordo com o solo a ser utilizado, podendo essa técnica ser aplicada tanto para o viés de ganho das propriedades mecânicas do solo, quanto para a biorremediação.

Tabela 4 – Resumo dos principais estudos sobre monitoramento da atividade ureolítica na biocimentação

Método de medição	Unidade	Aplicação	Características	Ref.
Condutividade elétrica	Condutividade elétrica da solução biocimentada aplicada (S/cm).	Avaliação de propriedades mecânicas do solo.	-Avaliação das propriedades mecânicas do solo através da variação de fatores como: concentração de bactérias, concentração da solução, tempo de reação, formas de cura e tipo de solo.	(ZHAO <i>et al.</i> 2014)
Produção de amônia	Determinação de uma curva aonde uma unidade de atividade ureolítica (U) é determinada de acordo com a quantidade de enzimas necessárias para hidrolisar 1 μ mol de ureia por minuto.	Biorremediação de Pb.	-Avaliação da atividade ureolítica durante o processo de biorremediação; -A atividade ureolítica não foi afetada em demasia devida a presença de Pb.	(MWANDIRA <i>et al.</i> 2017)
Condutividade elétrica e degradação de ureia	Condutividade elétrica (μ S/cm), e degradação de ureia (mM de ureia	Avaliar a eficiência ureolítica da bactéria <i>Bacillus megaterium</i> em condições óxidas e anóxicas.	-Atividade ureolítica em condições anóxicas mais eficientes correlacionado com maior atividade ureolítica.	(JIANG <i>et al.</i> , 2016)
Medição direta de ureia	Diminuição na concentração de ureia (mM).	Avaliação de propriedades mecânicas do solo.	-Avaliação de propriedades mecânicas do solo através de comparação em larga escala com espécimens com bioaumentação e através de estimulação de microrganismos nativos do solo.	(GOMEZ <i>et al.</i> , 2017)
Condutividade elétrica	Condutividade elétrica da solução biocimentada aplicada (S/cm).	Avaliação de graus de biocimentação.	-Estudo da influência da concentração química, tempo de retenção e atividade ureolítica da produção de CaCO_3 .	(QABANY <i>et al.</i> , 2012)
Produção de amônia	Quantidade produzida de $\text{NH}_3\text{-N}$ g^{-1} em mg.	Biorremediação de Ni.	-Avaliação da atividade ureolítica no processo de imobilização do metal.	(ZHU <i>et al.</i> , 2016)
Condutividade elétrica	Condutividade elétrica da solução biocimentada aplicada (S/cm).	Avaliação da produção de CaCO_3 em meio nutriente sólido (ágar) e líquido (solução de ureia).	-Correlação entre a condutividade elétrica, atividade ureolítica e a consequente produção de CaCO_3 .	(ZOHEIR <i>et al.</i> , 2013)

Ainda, conclui-se que a correlação entre a taxa de atividade ureolítica e a produção de CaCO_3 são extremamente dependentes, assim o monitoramento dessa atividade tem uma especificidade útil na atividade de biocimentação, independentemente do método de monitoramento.

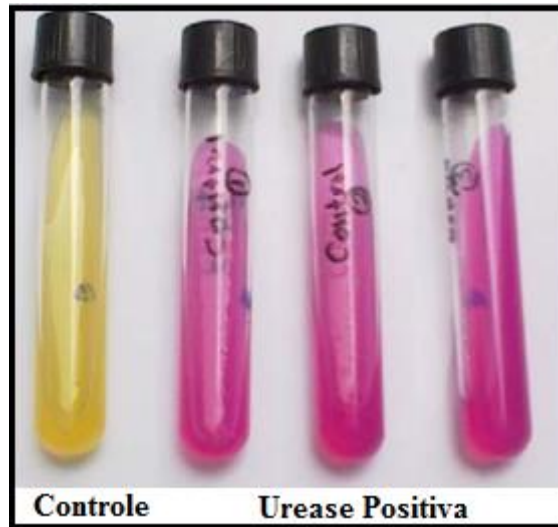


Figura 6 – Teste qualitativo UAB de Urease (Adaptado de Zoheir *et al* 2013)

4. CONCLUSÃO

O artigo discutiu as diversas aplicações na ciência da urease, avaliando parâmetros importantes no processo enzimático, bem como formas de medição nas diferentes áreas. As principais conclusões advindas deste estudo foram:

Na agricultura o problema de volatilização da amônia é evidente e o uso de inibidores de urease como o NBPTU e o SuperU, são alternativas viáveis no controle da emissão de NH_3 . Ainda, para o processo de medição da urease, fatores como a nitrificação de NH_3 evidenciada por Qin (2010) deve ser contabilizada nos cálculos da taxa ureolítica, assim como a medição por emissão de CO_2 deve separar as diferentes fontes produtoras do mesmo, para que a precisão seja aperfeiçoada.

No campo da engenharia, a urease mostra-se eficiente e promissora nos campos apresentados pelo artigo. Sobre o aumento de capacidade de carga dos solos, os estudos mostram o aumento de propriedades geomecânicas do solo com microrganismos nativos do solo, indicando a possibilidade da aplicação da técnica em larga escala para tratamentos *in situ*, sem bioaumentação. Ainda sobre o aumento de resistência de solos, não há registros sobre misturas de bactérias e seu desempenho na capacidade de biocimentação de solos, sendo uma sugestão para trabalhos futuros.

No campo da biorremediação, a imobilização de íons metálicos é promissora, e variáveis como a chuva devem ser adicionados nos experimentos para quantificar a lixiviação dos metais imobilizados no processo de biocimentação. Outro nicho existente dentro da biorremediação é a necessidade de monitoramento da lixiviação de metais tóxicos durante o processo de biocimentação, uma vez que a técnica pode ser aplicada para metais extremamente móveis, como o Cr^{6+} ; e, posteriormente ao encapsulamento dos íons metálicos pela técnica de biocimentação, é interessante a avaliação de lixiviação através de métodos como o TCLP (do inglês: Toxicity Characteristic Leaching Procedure), o qual garantirão a eficácia da técnica quanto a capacidade de imobilização/biomineralização de íons metálicos.

Ainda, novos materiais com propriedades de autocura, como argamassas, demonstram aplicabilidade prática em construções civis, trazendo benefícios em relação à ausência de manutenção

em caso de pequenas fissuras, os quais devem ser explorados separadamente devido a suas especificidades.

Quanto ao monitoramento da atividade ureolítica, especificamente no ramo da Engenharia, não há uma parametrização quanto ao método, ao passo que métodos de medição direta da degradação da ureia, bem como parâmetros correlatos, como a condutividade elétrica são aceitos e difundidos dentro da comunidade acadêmica. Outra forma, relativamente simples de monitoramento da urease é através do pH da solução lixiviada durante o processo de biocimentação, o qual ainda não há correlação direta com a taxa de urease (mmols), sendo esta uma indicação de estudo futuro.

7. REFERÊNCIAS

ACHAL, V.; MUKHERJEE, A.; BASU, P. C.; REDDY, M. S. Strain improvement of *Sporosarcina pasteurii* for enhanced urease and calcite production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 7, p. 981–988, 2009.

ACHAL, V.; PAN, X. Influence of calcium sources on microbially induced calcium carbonate precipitation by *Bacillus* sp. CR2. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 173, n. 1, p. 307–317, 2014.

ACHAL, V.; PAN, X.; FU, Q.; ZHANG, D. Biomineralization based remediation of As(III) contaminated soil by *Sporosarcina ginsengisoli*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 201–202, p. 178–184, 2012.

ACHAL, V.; PAN, X.; ZHANG, D.; FU, Q. Bioremediation of Pb-contaminated soil based on microbially induced calcite precipitation. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 244–247, 2012.

AL-SALLOUM, Y.; HADI, S.; ABBAS, H.; ALMUSALLAM, T.; MOSLEM, M. A. Bio-induction and bioremediation of cementitious composites using microbial mineral precipitation – A review. **Construction and Building Materials**, v. 154, p. 857–876, 2017.

BACHMEIER, K. L.; WILLIAMS, A. E.; WARMINGTON, J. R.; BANG, S. S. Urease activity in microbiologically-induced calcite precipitation. **Journal of Biotechnology**, v. 93, n. 2, p. 171–181, 2002.

BARABESI, C.; GALIZZI, A.; MASTROMEI, G.; ROSSI, M.; TAMBURINI, E.; PERITO, B. *Bacillus subtilis* gene cluster involved in calcium carbonate biomineralization. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 1, p. 228–235, 2007.

BOUWMAN, A. F.; BOUMANS, L. J. M.; BATJES, N. H. Estimation of global NH_3 volatilization loss from synthetic fertilizers and animal manure applied to arable lands and grasslands. **Global Biogeochemical Cycles**, v. 16, n. 2, p. 8-1-8–14, 2002.

CANTARELLA, H.; TRIVELIN, P. C. O.; CONTIN, T. L. M.; DIAS, F. L. F.; ROSSETTO, R.; MARCELINO, R.; COIMBRA, R. B.; QUAGGIO, J. A. Ammonia volatilisation from urease inhibitor-treated urea applied to sugarcane trash blankets. **Scientia Agricola**, v. 65, n. 4, p. 397–401, 2008.

CHENG, L.; CORD-RUWISCH, R. Upscaling Effects of Soil Improvement by Microbially Induced Calcite Precipitation by Surface Percolation. **Geomicrobiology Journal**, v. 31, n. 5, p. 396–406, 2014.

- CHRISTIANS, S.; KALTWASSER, H. Nickel-content of urease from *Bacillus pasteurii*. **Archives of Microbiology**, v. 145, n. 1, p. 51–55, 1986.
- CIURLI, S.; MARZADORI, C.; BENINI, S.; DEIANA, S.; GESSA, C. Urease from the soil bacterium *Bacillus pasteurii*: Immobilization on Ca-polygalacturonate. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 28, n. 6, p. 811–817, 1996.
- COSTAGLIOLA, P.; RIMONDI, V.; BENVENUTI..., M. Arsenic Uptake By Natural Calcites: Preliminary Results From Sequential Extraction of Italian Travertines. **IMWA Symposium 2007 ... VN - readcube.com**, n. May, 2007.
- CREASER, E. H.; PORTER, R. L. The purification of urease from *Aspergillus nidulans*. **International Journal of Biochemistry**, v. 17, n. 12, p. 1339–1341, 1985.
- DHAMI, N. K.; REDDY, M. S.; MUKHERJEE, M. S. Biomineralization of calcium carbonates and their engineered applications: A review. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. OCT, p. 1–13, 2013.
- DUO, L.; KAN-LIANG, T.; HUI-LI, Z.; YU-YAO, W.; KANG-YI, N.; SHI-CAN, Z. Experimental investigation of solidifying desert aeolian sand using microbially induced calcite precipitation. **Construction and Building Materials**, v. 172, p. 251–262, 2018.
- FENG, K.; MONTOYA, B. M. Drained Shear Strength of MICP Sand at Varying Cementation Levels. **Ifcee**, p. 2242–2251, 2015.
- FOLLMER, C. Ureases as a target for the treatment of gastric and urinary infections. **Journal of Clinical Pathology**, v. 63, n. 5, p. 424–430, 2010.
- GANG, J. G.; YUN, S. K.; HWANG, S. Y. *Helicobacter pylori* urease may exist in two forms: Evidence from the kinetic studies. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 12, p. 1565–1568, 2009.
- GISBERT, J. P.; CALVET, X. *Helicobacter pylori* “test-and-treat” strategy for management of dyspepsia: A comprehensive review. **Clinical and Translational Gastroenterology**, v. 4, n. 3, p. e32–17, 2013.
- GOMEZ, M. G.; ANDERSON, C. M.; GRADDY, C. M. R.; DEJONG, J. T.; NELSON, D. C.; GINN, T. R. Large-Scale Comparison of Bioaugmentation and Biostimulation Approaches for Biocementation of Sands. **Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering**, v. 143, n. 5, p. 04016124, 2017.
- GUETTES, R.; DOTT, W.; EISENTRAEGER, A. Determination of urease activity in soils by carbon dioxide release for ecotoxicological evaluation of contaminated soils. **Ecotoxicology**, v. 11, n. 5, p. 357–364, 2002.
- HARKES, M. P.; PAASSEN, L. A. VAN; BOOSTER, J. L.; WHIFFIN, V. S.; LOOSDRECHT, M. C. M. VAN. Fixation and distribution of bacterial activity in sand to induce carbonate precipitation for ground reinforcement. **Ecological Engineering**, v. 36, n. 2, p. 112–117, 2010.
- HASAN, H. A. H. Ureolytic microorganisms and soil fertility: A review. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 31, n. 15–16, p. 2565–2589, 2000.

HOLM, L.; SANDER, C. An evolutionary treasure: Unification of a broad set of amidohydrolases related to urease. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 28, n. 1, p. 72–82, 1997.

JEAN-MARC, B.; CORINNE, L. Interactions of Soil Minerals with Organic Components and Microorganisms. n. March, p. 1–3, 2015.

JIANG, N. J.; YOSHIOKA, H.; YAMAMOTO, K.; SOGA, K. Ureolytic activities of a urease-producing bacterium and purified urease enzyme in the anoxic condition: Implication for subseafloor sand production control by microbially induced carbonate precipitation (MICP). **Ecological Engineering**, v. 90, p. 96–104, 2016.

JOSHI, S.; GOYAL, S.; MUKHERJEE, A.; REDDY, M. S. Microbial healing of cracks in concrete: a review. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 44, n. 11, p. 1511–1525, 2017.

KANG, C. H.; HAN, S. H.; SHIN, Y.; OH, S. J.; SO, J. S. Bioremediation of Cd by microbially induced calcite precipitation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 6, p. 2907–2915, 2014.

KANG, C. H.; KWON, Y. J.; SO, J. S. Bioremediation of heavy metals by using bacterial mixtures. **Ecological Engineering**, v. 89, p. 64–69, 2016.

KARPLUS, P. A.; PEARSON, M. A.; HAUSINGER, R. P. 70 Years of Crystalline Urease: What Have We Learned? **Accounts of Chemical Research**, v. 30, n. 8, p. 330–337, 1997.

KESHAVARZ AFSHAR, R.; LIN, R.; MOHAMMED, Y. A.; CHEN, C. Agronomic effects of urease and nitrification inhibitors on ammonia volatilization and nitrogen utilization in a dryland farming system: Field and laboratory investigation. **Journal of Cleaner Production**, v. 172, p. 4130–4139, 2018.

KRAJEWSKA, B. Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 59, n. 1–3, p. 9–21, 2009. Urease-aided calcium carbonate mineralization for engineering applications: A review. **Journal of Advanced Research**, 2017.

KRAJEWSKA, B.; ELDIK, R. VAN; BRINDELL, M. Temperature- and pressure-dependent stopped-flow kinetic studies of jack bean urease. Implications for the catalytic mechanism. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 17, n. 7, p. 1123–1134, 2012.

KRAJEWSKA, B.; ZABORSKA, W. The effect of phosphate buffer in the range of pH 5.80–8.07 on jack bean urease activity. **Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic**, v. 6, n. 1–2, p. 75–81, 1999.

LI, L.; AMINI, F.; ZHAO, Q.; LI, C.; WEN, K.; LI, M.; OGBONNAYA, U. Development of a Flexible Mold for Bio-Mediated Soil Materials. **Ifcee 2015**, p. 2339–2348, 2015.

LI, X.; PENG, W.; JIA, Y.; LU, L.; FAN, W. Bioremediation of lead contaminated soil with *Rhodobacter sphaeroides*. **Chemosphere**, v. 156, p. 228–235, 2016.

MENEGASSI, A.; WASSERMANN, G. E.; OLIVERA-SEVERO, D.; BECKER-RITT, A. B.; MARTINELLI, A. H. S.; FEDER, V.; CARLINI, C. R. Urease from cotton (*Gossypium hirsutum*) seeds: Isolation, physicochemical characterization, and antifungal properties of the protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 12, p. 4399–4405, 2008.

MUJAH, D.; SHAHIN, M. A.; CHENG, L. State-of-the-Art Review of Biocementation by Microbially Induced Calcite Precipitation (MICP) for Soil Stabilization. **Geomicrobiology Journal**, v. 34, n. 6, p. 524–537, 2017.

MWANDIRA, W.; NAKASHIMA, K.; KAWASAKI, S. Bioremediation of lead-contaminated mine waste by *Pararhodobacter* sp. based on the microbially induced calcium carbonate precipitation technique and its effects on strength of coarse and fine grained sand. **Ecological Engineering**, v. 109, n. September, p. 57–64, 2017.

NG, W.; LEE, M.; HII, S. An overview of the factors affecting microbial-induced calcite precipitation and its potential application in soil improvement. **World Academy of Science, Engineering and Technology**, v. 62, n. 2, p. 723–729, 2012.

PAASSEN, L. A. VAN; GHOSE, R.; LINDEN, T. J. M. VAN DER; STAR, W. R. L. VAN DER; LOOSDRECHT, M. C. M. VAN. Quantifying Biomediated Ground Improvement by Ureolysis: Large-Scale BiogROUT Experiment. **Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering**, v. 136, n. 12, p. 1721–1728, 2010.

PEDREIRA, R. R. Bio-cementation of sandy soils for improving their hydro-mechanical characteristics. v. 3, n. 2, p. 1–10, 2012.

PETTIT, N. M.; SMITH, A. R. J.; FREEDMAN, R. B.; BURNS, R. G. Soil urease: Activity, stability and kinetic properties. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 8, n. 6, p. 479–484, 1976.

PHILLIPS, A. J.; GERLACH, R.; LAUCHNOR, E.; MITCHELL, A. C.; CUNNINGHAM, A. B.; SPANGLER, L. Engineered applications of ureolytic biomineralization: A review. **Biofouling**, v. 29, n. 6, p. 715–733, 2013.

PHILLIPS, A. J.; LAUCHNOR, E.; ELDRING, J. J.; ESPOSITO, R.; MITCHELL, A. C.; GERLACH, R.; CUNNINGHAM, A. B.; SPANGLER, L. H. Potential CO₂ Leakage Reduction through Bio fi lm-Induced Calcium Carbonate Precipitation. p. 2–9, 2013.

PINTON, R.; TOMASI, N.; ZANIN, L. Molecular and physiological interactions of urea and nitrate uptake in plants. **Plant Signaling and Behavior**, v. 11, n. 1, 2016.

POLACCO, J. C. Is nickel a universal component of plant ureases? **Plant Science Letters**, v. 10, n. 3, p. 249–255, 1977.

POLACCO, J. C.; HOLLAND, M. A. Role of Urease in Plant Cell. **International Review of Cytology**, v. 145, p. 65–103, 1993.

QABANY, A. AL; SOGA, K.; SANTAMARINA, C. Factors Affecting Efficiency of Microbially Induced Calcite Precipitation. **Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering**, v. 138, n. 8, p. 992–1001, 2012.

RANDALL, D. G.; NAIDOO, V. Urine: The liquid gold of wastewater. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 6, n. 2, p. 2627–2635, 2018.

ROCHETTE, P.; ANGERS, D. A.; CHANTIGNY, M. H.; MACDONALD, J. D.; GASSER, M. O.;

BERTRAND, N. Reducing ammonia volatilization in a no-till soil by incorporating urea and pig slurry in shallow bands. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 84, n. 1, p. 71–80, 2009.

ROCHETTE, P.; MACDONALD, J. D.; ANGERS, D. A.; CHANTIGNY, M. H.; GASSER, M.-O.; BERTRAND, N. Banding of Urea Increased Ammonia Volatilization in a Dry Acidic Soil. **Journal of Environment Quality**, v. 38, n. 4, p. 1383, 2009.

SADEGHPOUR, A.; HASHEMI, M.; WEIS, S. A.; SPARGO, J. T.; MEHRVARZ, S.; HERBERT, S. J. Assessing Tillage Systems for Reducing Ammonia Volatilization from Spring-Applied Slurry Manure. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 46, n. 6, p. 724–735, 2015.

SAHAY, P.; WEST, A. P.; HAWKEY, P. M.; AXON, A. T. R. Isolation of *Helicobacter pylori* from faeces. **Journal of Infection**, v. 30, n. 3, p. 262–263, 1995.

SALIFU, E.; MACLACHLAN, E.; IYER, K. R.; KNAPP, C. W.; TARANTINO, A. Application of microbially induced calcite precipitation in erosion mitigation and stabilisation of sandy soil foreshore slopes: A preliminary investigation. **Engineering Geology**, v. 201, p. 96–105, 2016.

SCHNEIDER, J.; KALTWASSER, H.; STADTWALD, I. Hicroidology. p. 355–360, 1984.

SEO, J.-H. Limitations of urease test in diagnosis of pediatric *Helicobacter pylori* infection. **World Journal of Clinical Pediatrics**, v. 4, n. 4, p. 143, 2015.

SHARMA, A.; R., R. Study on effect of Microbial Induced Calcite Precipitates on strength of fine grained soils. **Perspectives in Science**, v. 8, p. 198–202, 2016.

SIMKISS, K. **Variations in the crystalline form of calcium carbonate precipitated from artificial sea water** [15]*Nature*, 1964.

SINSABAUGH, R. L.; REYNOLDS, H.; LONG, T. M. Rapid assay for amidohydrolase (urease) activity in environmental samples. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 32, n. 14, p. 2095–2097, 2000.

SIRKO, A.; BRODZIK, R. Plant ureases: Roles and regulation. **Acta Biochimica Polonica**, v. 47, n. 4, p. 1189–1195, 2000.

SMITH, P. T.; KING, A. D.; GOODMAN, N. Isolation and characterization of urease from *Aspergillus niger*. **Journal of General Microbiology**, v. 139, n. 5, p. 957–962, 1993.

SOMMER, S. G.; SCHJOERRING, J. K.; DENMEAD, O. T. Ammonia Emission from Mineral Fertilizers and Fertilized Crops. v. 2113, n. October, p. 557–622, 2004.

STOCKS-FISCHER, S.; GALINAT, J. K.; BANG, S. S. Microbiological precipitation of CaCO_3 . **Soil Biology and Biochemistry**, v. 31, p. 1563–1571, 1999.

SUMNER, B.; HAND, B. Urea Hydrolysis by Urease. v. 108, n. 1924, p. 333–342, 1931.

TABATABAI, M. A.; BREMNER, J. M. Assay of urease activity in soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 4, n. 4, p. 479–487, 1972.

TODD, M. J.; HAUSINGER, R. P. Purification and characterization of the nickel-containing multicomponent urease from *Klebsiella aerogenes*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 13, p.

5963–5967, 1987.

UOTANI, T.; GRAHAM, D. Y. Diagnosis of *Helicobacter pylori* using the rapid urease test. **Annals of Translational Medicine**, v. 3, n. 1, p. 1–7, 2015.

WHIFFIN, V. S. Microbial CaCO_3 Precipitation for the Production of Biocement. **Phd Thesis**, n. September, p. 1–162, 2004.

WOLFENDEN, R.; SNIDER, M. J. The depth of chemical time and the power of enzymes as catalysts. **Accounts of Chemical Research**, v. 34, n. 12, p. 938–945, 2001.

XU, G.; FAN, X.; MILLER, A. J. Plant Nitrogen Assimilation and Use Efficiency. **Annual Review of Plant Biology**, v. 63, n. 1, p. 153–182, 2012.

YASUHARA, H.; NEUPANE, D.; HAYASHI, K.; OKAMURA, M. Experiments and predictions of physical properties of sand cemented by enzymatically-induced carbonate precipitation. **Soils and Foundations**, v. 52, n. 3, p. 539–549, 2012.

ZANTUA, M. I.; BREMNER, J. M. Comparison of methods of assaying urease activity in soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 7, n. 4–5, p. 291–295, 1975.

ZERNER, B. Recent advances in the chemistry of an old enzyme, urease. **Bioorganic Chemistry**, v. 19, n. 1, p. 116–131, 1991.

ZHANG, F.; YE, B.; YE, G. A Unified Description of Toyoura Sand. p. 663–674, 2013.

ZHAO, Q.; LI, L.; LI, C.; LI, M.; AMINI, F.; ZHANG, H. Factors affecting improvement of engineering properties of micp-treated soil catalyzed by bacteria and urease. **Journal of Materials in Civil Engineering**. 2014a

ZHU, X.; LI, W.; ZHAN, L.; HUANG, M.; ZHANG, Q.; ACHAL, V. The large-scale process of microbial carbonate precipitation for nickel remediation from an industrial soil. **Environmental Pollution**, v. 219, p. 149–155, 2016.

ZOHEIR, A. E.; HAMMAD, I. A.; TALKHAN, F. N. Urease activity and induction of calcium carbonate precipitation by *Sporosarcina pasteurii* NCIMB 8841. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 9, n. 3, p. 1525–1533, 1525.