

## **Pertumbuhan Populasi Mikroalga *Spirulina platensis* (Geitler) Pada Konsentrasi Logam Berat Tembaga (Cu)**

### **Microalgae *Spirulina platensis* (Geitler) Population Growth In Heavy Metal Concentrations of Copper (Cu)**

**Danu Maulana Yusuf**

**Jurusan Biologi Fakultas Sains Dan Matematika Universitas Diponegoro  
Tembalang – Semarang, Indonesia**

*E-mail : danumaulanayusuf@gmail.com*

#### **ABSTRACT**

One of heavy metal which is a source of pollution and need to be minimized its concentration on water is heavy metal cooper (Cu). In humans, chronic Cu poisoned lead to liver cirrhosis, brain damage, kidney damage and deposition of Cu in the cornea of the eye. The concentration of heavy metals in water can be remediate using microalgae, related to its biosorption potential some research on heavy metal binding ions to microalgae has been done, species *Chlorella vulgaris*, *Phormidium sp.*, *Dunaliella tertiolecta*, *Nostoc sp.*, *Euglena gracilis* has a high tolerance to heavy metal ions. The purpose of this study is to examine the effect of heavy metals Cu on populations of *S. platensis* and determine a decrease in the concentration of heavy metals Cu in cultures of *S. platensis*, compared to the long presentation time. Research using 4 treatment concentrations of Cu ie 0; 1; 3; and 5 mg / l with 3 replications respectively. The results showed the concentration of Cu treatment affects the population growth of *S. platensis*. *S. platensis* able to decrease the concentration of Cu in the culture medium. The larger the population of *S. platensis*, the greater absorption of Cu by the cell. The decrease percentage in Cu in the medium is directly proportional to the exposure time needed. *S. platensis* can be used as fikoremediator of heavy metal Cu at a concentration 1 mg / l of Cu.

*Keywords: Spirulina platensis, Fikoremediation, Biosorption, Heavy metals, Cu.*

#### **ABSTRAK**

Salah satu logam berat yang merupakan sumber polusi dan perlu diminimalkan konsentrasinya dalam perairan adalah logam berat tembaga (Cu). Pada manusia, keracunan Cu secara kronis dapat mengakibatkan sirosis hati, kerusakan otak, kerusakan ginjal dan pengendapan Cu dalam kornea mata. Konsentrasi logam berat di perairan dapat diremediasi menggunakan mikroalga, terkait dengan potensi biosorpsinya beberapa penelitian mengenai ikatan ion logam berat dengan mikroalga telah dilakukan, jenis *Chlorella vulgaris*, *Phormidium sp.*, *Dunaliella tertiolecta*, *Nostoc sp.*, *Euglena gracilis* memiliki toleransi yang tinggi terhadap ion logam berat. Tujuan dari penelitian ini adalah mengkaji pengaruh logam berat Cu terhadap populasi *S. platensis* dan mengetahui penurunan konsentrasi logam berat Cu dalam kultur *S. platensis*, dibandingkan dengan lama waktu pemaparannya. Penelitian menggunakan 4 perlakuan konsentrasi logam Cu yaitu 0; 1; 3; dan 5 mg/l masing-masing 3 ulangan. Hasil penelitian menunjukkan perlakuan konsentrasi Cu mempengaruhi pertumbuhan populasi *S. platensis*. *S. platensis* mampu menurunkan konsentrasi Cu dalam media kultur. Semakin besar populasi *S. platensis* maka semakin besar penyerapan Cu oleh sel. Persentasi penurunan Cu dalam medium berbanding lurus dengan waktu papar yang dibutuhkan. *S. platensis* dapat dijadikan fikoremediator logam berat Cu pada konsentrasi Cu 1 mg/l.

*Kata Kunci : Spirulina platensis, Fikoremediasi, Biosorpsi, Logam berat, Cu.*

#### **PENDAHULUAN**

Salah satu pencemaran pada badan air adalah masuknya logam berat. Salah satu

logam berat yang merupakan sumber polusi dan perlu diminimalkan konsentrasinya dalam perairan adalah logam tembaga (Cu). Menurut Surat keputusan Menteri Negara

Kependudukan dan Lingkungan Hidup nomor 202 tahun 2004 SNI 06-6989-6-2004, kadar maksimal limbah yang boleh dialirkan ke air permukaan untuk Cu sebesar 2 mg/L. Pada manusia, keracunan Cu secara kronis dapat mengakibatkan sirosis hati, kerusakan otak, kerusakan ginjal, dan pengendapan Cu dalam kornea mata (Darmono, 2006).

Salah satu metode untuk menurunkan kandungan logam Cu dalam air adalah *treatment* sorpsi yang melibatkan interaksi antara analit dengan permukaan zat padat (adsorben) (Diantariani, 2008). Salah satu organisme yang diketahui memiliki potensi biosorpsi adalah mikroalga, biosorpsi merupakan proses utama dari jenis adsorpsi yang berlangsung melalui daya tarik elektrostatis dari kation logam menjadi bermuatan negatif pada permukaan sel mikroalga (Hirato, 1992).

Beberapa penelitian mengenai ikatan ion logam berat dengan mikroorganisme secara umum telah banyak dilakukan, mikroalga *Chlorella vulgaris*, *Phormidium sp*, *Dunaliella tertiolecta*, *Nostoc sp*, *Euglena gracilis* memiliki toleransi yang tinggi terhadap pengambilan ion logam berat (Suhendrayatna, 2001). Penelitian yang menggunakan *Spirulina sp*, membandingkan proses 4 bioakumulasi dan biosorpsi dalam bentuk *immobilized living cells* (Chojnacka, 2007). *Spirulina* memiliki

kapasitas adsorpsi yang tinggi, mengikat ion-ion logam dari larutan dan mengadsorpsi logam berat karena di dalam alga terdapat gugus fungsi yang dapat melakukan pengikatan dengan ion logam oleh sebab itu *Spirulina* sering digunakan untuk menghilangkan logam berat (Darmono, 2006). *Spirulina sp* merupakan biosorben dari ion  $Cr^{3+}$ ,  $Cd^{2+}$  dan  $Cu^{2+}$  (Chojnacka et al., 2005).

Fikoremediasi telah dilakukan terhadap kontaminasi logam berat yang berasal dari pertambangan dan industri di Afrika selatan *Spirulina* memiliki ambang batas sebesar 1,9 mg untuk tembaga, seng dan timbal. *Spirulina* memiliki potensi sebagai agen peng-endap, dengan kemampuannya untuk mempertahankan pH basa pada medium dengan enzim karbonik anhidrase (Payne, 2000).

Tujuan dari penelitian ini adalah mengkaji pengaruh logam berat Cu terhadap populasi *S. platensis* dan mengetahui penurunan konsentrasi logam berat Cu dalam kultur *S. platensis*, dibandingkan dengan lama waktu pemaparannya.

## METODE PENELITIAN

Penelitian menggunakan 4 perlakuan konsentrasi logam Cu yaitu 0; 1; 3; dan 5 mg/l dengan 3 ulangan. Populasi awal *S.*

*platensis* sebagai inokulum adalah 10.000 sel/ml, volume medium 1 liter dengan salinitas 15 ppt, 0,5 ml/l pupuk Walne.

Penelitian dilakukan selama 14 hari. Faktor eksternal: salinitas, pH, suhu, DO dan intensitas cahaya dijaga selalu setiap harinya. Jumlah populasi *S. platensis* dihitung setiap harinya dengan rentang waktu 24 jam. Pengambilan sampel untuk analisis konsentrasi Cu di dalam medium dan *S. platensis* dilakukan pada hari ke- 0; ke- 7; dan ke- 14. Populasi dihitung menggunakan SRC dengan rumus

$$N_1 \text{ (sel/ml)} = \{(C \times 1000)/(A \times F)\} / R$$

Keterangan :

- $N_1$  = Kelimpahan Sel
- $C$  = Jumlah sel terhitung
- $A$  = Konstanta (3,14)
- $R$  = Pengenceran
- $F$  = Jumlah bidang pandang

Persentase penurunan konsentrasi logam berat dapat dihitung dengan rumus :

$$[(C_o - C_t) / C_o] \times 100 \%$$

- $C_o$  = Konsentrasi awal
- $C_t$  = Konsentrasi akhir

Untuk mengetahui toksisitas dan jumlah akumulasi logam berat pada *S. platensis* menggunakan BCF. BCF adalah perbandingan antara konsentrasi kimia dalam organisme dengan konsentrasi dalam lingkungan (Soeprbowati dan Hariyati, 2013).

$$BCF = C_{org} / C_{media}$$

Data pertumbuhan populasi dan penurunan konsentrasi logam berat Cu pada kultur *S. platensis* dianalisis dengan analisis deskriptif kuantitatif.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Faktor Eksternal

Faktor eksternal yang diamati antara lain yaitu suhu, pH, salinitas, DO, dan intensitas cahaya. Berdasarkan hasil pengamatan diperoleh faktor eksternal (tabel.1). Faktor eksternal berada pada rentang yang optimal untuk pertumbuhan *S. platensis*, dimana suhu yaitu 25 - 35 °C dan pH 7,2- 9,5 (Isnansetyo dan Kurniastuty, 1995). Temperatur mempengaruhi semua aktifitas metabolisme, keberadaan dan pengambilan nutrisi (Vonshak, 1997). Sedangkan perubahan nilai pH yang drastis dapat mempengaruhi kerja enzim dan menghambat proses fotosintesis dan pertumbuhan (Soeprbowati, 2013).

Tabel 1. Faktor eksternal kultur *S. platensis*

Parameter	Hasil	Optimal
Suhu (0C)	28 - 29	25 - 35
pH	8 - 9	7,2 - 9,5
Salinitas (ppt)	15 - 17 2,95 -	15 - 20
DO (ppm)	3,27	3,0
Intensitas cahaya (lux)	2000 - 2800	1500 - 3000

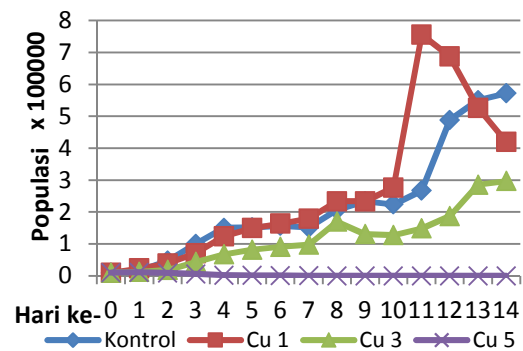
Salinitas yang digunakan pada awal adalah 15 ppt, menurut Hariyati (2008) salinitas yang optimal untuk pertumbuhan

*Spirulina sp* adalah berkisar antara 15-20 ppt. Salinitas berpengaruh terhadap organisme air dalam mempertahankan tekanan osmotiknya.

Nilai Oksigen terlarut (DO) dan intensitas cahaya masih sesuai untuk pertumbuhan mikroalga, DO minimal yang diperlukan oleh mikroalga adalah 3,0 ppm (Vonshak, 1997) dan intensitas cahaya 1500- 3000 lux (Soong, 1980). Oksigen dimanfaatkan oleh organisme perairan untuk proses respirasi dan menguraikan zat organik menjadi zat an-organik. Oksigen terlarut dalam air berasal dari difusi udara dan hasil fotosintesis organisme berklorofil yang hidup dalam suatu perairan dan dibutuhkan oleh organisme untuk mengoksidasi zat hara yang masuk ke dalam tubuhnya (Nybakken, 1988). Faktor suhu dan salinitas juga mempengaruhi besarnya oksigen terlarut, rendahnya suhu akan meningkatkan kadar oksigen sedangkan bertambahnya salinitas akan mengurangi kadar oksigen (Odum, 1971).

### Populasi Kultur *Spirulina plantesis*

Kelimpahan *S. platensis* yang di masukan kedalam medium kultur pada hari ke-0 adalah sebanyak 10.000 sel/ml.



Gambar 1. Rata-rata populasi *S. platensis* seluruh perlakuan

Perlakuan Cu 5 mg pada hari ke-8 terjadi kematian kultur. Kematian terjadi dikarenakan konsentrasi logam berat sudah bersifat toksik. Toksisitas Cu mempengaruhi pigmen dan biosintesis lipid dan ultrastruktur kloroplas sehingga secara negatif mempengaruhi efisiensi fotosintesis (Payne, 2000).

Fase lag terjadi pada hari ke-2 masing-masing pada perlakuan kontrol; Cu 1 mg; dan Cu 3 mg. Menurut Edhy *et al* (2003), penambahan massa atau pertumbuhan jumlah sel belum begitu terjadi dikarenakan pengaturan suatu aktivitas *S. platensis* dalam lingkungan baru.

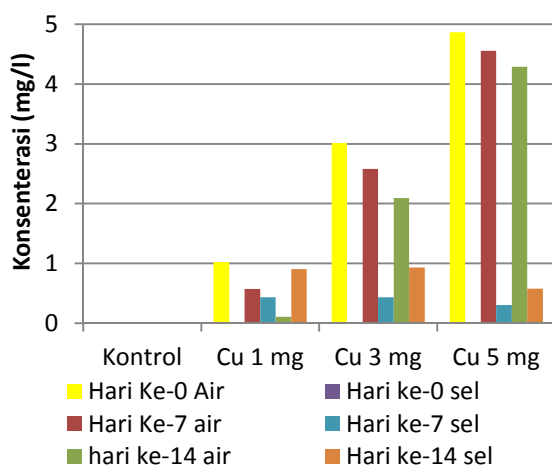
Pada hari ke-3 sampai hari ke-9 mulai terjadi fase eksponensial pada perlakuan kontrol; Cu 1 mg; dan Cu 3 mg, dimana terjadi peningkatan aktivitas pertumbuhan, pada tahap ini rata-rata pertumbuhan populasi paling tinggi terjadi pada perlakuan Cu 1 mg dengan 233.970 sel/ml. Menurut Richmond (2004), konsentrasi Cu yang rendah memegang peranan yang penting dalam proses metabolisme sel,

dalam reaksi enzim untuk biosintesis senyawa yang dibutuhkan sel.

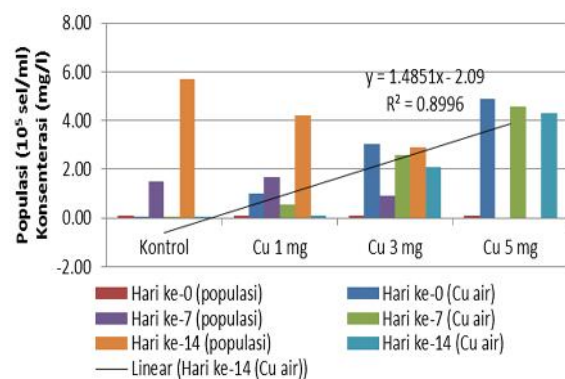
Perlakuan Cu 3 mg memiliki pertumbuhan populasi yang lebih rendah dibandingkan dengan kontrol, konsentrasi Cu 3 mg menghambat metabolisme *S. platensis* karena sifat toksik yang dimiliki oleh ion logam pada saat absorpsi atau metabolisme aktif. Menurut Payne (2000), metabolisme pengikatan ion logam secara aktif dimungkinkan disertai dengan gejala toksik. Pada saat toksik sudah berada dalam sel, ion logam terikat pada organel sel atau dengan protein seperti metalotionen akan meningkatkan permeabilitas membran sehingga menghambat interaksi intraseluler sel.

### Konsentrasi Cu pada kultur *S. platensis*

Analisis yang dilakukan adalah konsentrasi Cu dalam air dan konsentrasi Cu dalam sel *S. platensis* pada hari ke-0, ke-7, dan ke-14.



Gambar 2. Konsentrasi Cu dalam air dan sel *S. platensis*



Gambar 3. Hubungan antara konsentrasi logam Cu dan populasi *S. platensis*.

Dari hasil analisis diketahui bahwa konsentrasi Cu pada medium kontrol pada hari ke-0 adalah sebesar 0,012 mg/l. Menurut Effendi (2003), pada perairan laut kadar Cu berkisar antara 0.001 – 0.025 mg/l. Dalam sel *S. platensis* kultur kontrol juga terdapat Cu dengan konsentrasi 0.003 mg/l, hal ini dikarenakan logam berat Cu yang terdapat dalam sel *S. platensis* merupakan kompartemen sel seperti koenzim ataupun mikromineral yang dibutuhkan untuk metabolisme (Richmond, 2004). Dengan hadirnya logam berat dengan konsentrasi natural maka diasumsikan bahwa pertumbuhan populasi yang terjadi pada perlakuan ini tidak dipengaruhi oleh kehadiran logam berat Cu.

Analisis sampel perlakuan Cu 1 mg pada hari ke-0 konsentrasi Cu pada air adalah sebesar 1,02 mg/l sedangkan pada sel *S. platensis* 0,003 mg/l. Pada hari ke-7 *S. platensis* mampu menyerap Cu sebanyak 0,429 mg. Sedangkan sampai hari ke-14

akumulasi logam Cu pada sel *S. platensis* adalah 0,904 mg/l dan pada air 0,108 mg/l.

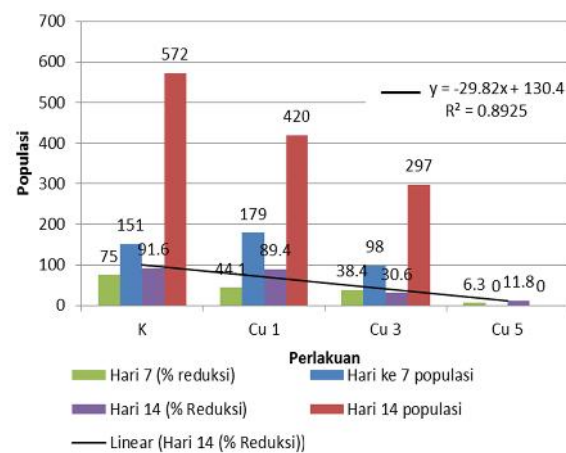
Analisis kultur perlakuan Cu 3 mg pada hari ke-0 diketahui bahwa konsentrasi Cu pada air adalah 3,017 mg/l sedangkan pada sel *S. platensis* 0,006 mg/l. Akumulasi Cu dalam sel pada hari ke-7 adalah sebesar 0,428 mg/l. Pada hari ke-14 konsentrasi Cu pada air sebesar 2,029 mg/l dan dalam sel *S. platensis* naik menjadi 0.93 mg/l. Selama 14 hari *S. platensis* mampu mengakumulasi 0,93 mg/l pada konsentrasi perlakuan 3 mg/l.

Analisis sampel pada hari ke-0 perlakuan Cu konsentrasi 5 mg menunjukkan konsentrasi Cu pada awal baik pada air dan sel *S. platensis* masing-masing adalah 4,869 mg dan 0.007 mg. Pada analisis hari ke-7 terjadi penurunan konsentrasi Cu sebesar 0,310 mg. Analisis pada hari ke-14 penurunan konsentrasi Cu sebesar 0,269 mg. Meskipun diketahui dari data hasil pengamatan populasi pada perlakuan Cu 5 mg terjadi kematian kultur karena toksik. Meskipun sel mati namun masih dapat menyerap ion logam berat Cu melalui mekanisme pasif atau adsorpsi melalui dinding sel (Payne, 2000).

Jika dilihat besar konsentrasi logam Cu dalam medium kultur maka terdapat perbedaan pertumbuhan populasi pada masing-masing konsentrasi yang diberikan. Ada hubungan yang kuat antara

konsentrasi Cu dalam medium dengan pertumbuhan populasi *S. platensis* dengan  $R^2 = 0,89$  dengan bentuk hubungannya  $y = 1.4851x - 2.09$ . Dimana semakin tinggi konsentrasi logam Cu yang di paparkan maka semakin lambat pertumbuhan populasi *S. platensis*.

Dilihat dari diagram perbandingan antara populasi dan persentasi penurunan logam berat diatas pada perlakuan Cu 1 mg memiliki persentasi penurunan sebesar 44,1 % pada hari ke-7 dan 89,4 % pada hari ke-14. Perlakuan Cu 1 mg memiliki persentasi penurunan logam Cu terbesar dibandingkan dengan perlakuan konsentrasi Cu 3 mg dan 5 mg. Diketahui bahwa pada konsentrasi 3 dan 5 mg/l menghambat pertumbuhan populasi.

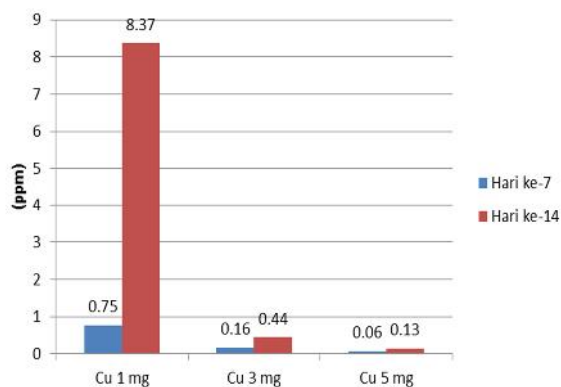


Gambar 4. Persentasi penurunan Cu pada medium kultur perlakuan kontrol, Cu 1 mg, Cu3 mg dan Cu5 mg

Berdasarkan persentasi penurunan logam berat dan populasi *S. platensis* diketahui bahwa semakin besar populasi maka semakin besar penyerapan logam Cu

oleh sel. Pada perlakuan Cu 1 mg terjadi populasi dan persentasi penyerapan logam Cu tertinggi yaitu 89,4 %. Dengan demikian ada hubungan yang kuat antara besar populasi dengan persentasi penurunan logam Cu dalam medium dengan  $R^2 = 0.8925$  dengan bentuk hubungan  $y = -29.82x + 130.4$ . Dilihat dari persentasi penurunan yang semakin bertambah pada hari ke-14. Persentasi penurunan logam Cu dalam medium juga berbanding lurus dengan waktu papar yang dibutuhkan (Richmond, 2004). Dimana semakin lama *S. platensis* terpapar logam berat maka semakin besar juga penyerapan yang dilakukan.

Toksisitas logam berat terhadap organisme dapat diketahui dengan pendekatan *Bioaccumulation Factor* (BCF). BCF dihitung untuk menentukan jumlah akumulasi logam berat pada *S. platensis* (Soeprbowati dan Hariyati, 2013).



Gambar 5. Nilai BCF Cu dalam kultur *S. platensis*

Cu 1 mg memiliki nilai BCF tertinggi pada hari ke-7 maupun hari ke-14. Tingginya nilai BCF pada perlakuan Cu 1 mg sebanding dengan pertumbuhan populasi yang paling tinggi dan puncak pertumbuhan yang tercepat. Nilai BCF pada Cu 1 mg pada hari ke-7 adalah 0,75 ppm dan pada hari ke-14 adalah 8,37 ppm. Semakin tinggi nilai BCF menandakan organisme tersebut semakin resisten terhadap logam berat, dan dapat dijadikan akumulator logam berat. Menurut Conti and Cecchetti (2003) dalam Soeprbowati dan Hariyati (2013) nilai BCF yang lebih besar dari 1 ppm mengindikasikan akumulator logam berat. Pada konsentersasi Cu 1 mg/l *S. platensis* dapat mengakumulasi ion logam berat dengan baik, terlihat dari nilai BCF yang lebih dari 1 ppm, presentasi penyerapan logam berat sebesar 89,4 % pada hari ke-14, dan pertumbuhan populasi yang lebih baik dibandingkan dengan kontrol.

Nilai BCF pada perlakuan Cu 3 mg dan 5 mg rendah. Hal ini berarti bahwa konsentersasi logam berat pada masing-masing perlakuan yakni 3 dan 5 mg sudah bersifat toksik, sejalan dengan persentasi penyerapan logam berat pada kedua perlakuan tersebut hanya mampu menyerap 30,6 % dan 11,8 %. Dalam konsentersasi yang tinggi, logam berat mengurangi populasi atau pertumbuhan sel sebab

mikroalga tidak dapat mengimbangi toksisitas logamnya (Soeprbowati dan Hariyati, 2013). Terlihat pada populasi pada perlakuan tersebut dimana populasi perlakuan 3 mg berada dibawah kontrol dan kematian pada perlakuan 5 mg.

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan, *S. platensis* dapat diaplikasikan untuk remediasi logam berat Cu dengan konsentersasi 1 mg/l.

### SIMPULAN

Konsentersasi logam berat Cu mempengaruhi pertumbuhan populasi *S. platensis*. Konsentersasi Cu 1 mg/l mempercepat pertumbuhan populasi, konsentersasi Cu 3 mg/l menghambat dan konsentersasi Cu 5 mg/l toksik. *S. platensis* mampu menurunkan konsentersasi logam berat Cu dalam media kultur. Semakin besar populasi *S. platensis* maka semakin besar penyerapan logam Cu oleh sel. Persentasi penurunan logam Cu dalam medium berbanding lurus dengan waktu papar yang dibutuhkan. *S. platensis* dapat dijadikan akumulator logam berat pada konsentersasi Cu 1 mg/l.

### DAFTAR PUSTAKA

- Chojnacka K., Chojnacka A., and Gorecka H., 2005, Biosorption of Cr<sup>3+</sup>, Cd<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup> ions by blue-green algae *Spirulina sp.*: kinetics, equilibrium and the mechanism of the process, *Chemosphere*, 59:75-84
- Chojnacka, K. (2007). "Bioaccumulation of Cr(III) Ions by Blue-Green Alga *Spirulina sp.* Part I. A Comparison with Biosorption". *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*.
- Darmono. 2006. *Lingkungan Hidup dan Pencemaran*. Universitas Indonesia. UI-Press.
- Diantariani N.P., Sudiarta I.W., Elantiani N.K. (2008). "Proses Biosorpsi dan Desorpsi Ion Cr(VI) Pada Biosorben Rumput Laut *Eucheuma spinosum*". Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana, Bukit Jimbaran. *Jurnal Kimia* 2 (1) Januari,
- Effendi, H. 2003. *Telaah Kualitas Air bagi Pengelolaan Sumber Daya dan Lingkungan Perairan*. Cetakan Kelima. Yogyakarta : Kanisius.
- Hariyati, R. 2008. *Pertumbuhan Dan Biomassa Spirulina sp dalam skala Laboratoris*. Laboratorium Ekologi dan Biosistemik Jurusan Biologi FMIPA Undip. BIOMA, Juni, 2008. Vol. 10, No. 1, Hal. 19-22.
- Hirato, T.M. (1992). "Improvement of the stripping characteristics of Fe (III) utilizing a Mixture of di (2-ethylhexyl) Phosphoric Acid and tri-n-Butyl Phosphate". *Hydrometallurgi*,
- Nybakken, J. W. 1988. *Biologi Laut, Suatu Pendekatan Ekologi*. Alih bahasa oleh M. Eidman, Koesoebiono, D. G. Bengen, M. Hutomo dan S. Sukarjo. Gramedia Jakarta.
- Odum, E.P. 1971. *Fundamental of Ecology*. W.B. Saunder Com. Philadelphia 125 pp.



- Payne, R.A. 2000. *Spirulina As A Bioremediation Agent: Interaction With Metals And Involvement Of Carbonic Anhydrase*. Dept of Biochemistry and Microbiology. Rhodes University.
- Richmond, A. 2004. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Science Ltd. UK
- Soeprbowati, T.R. 2013. *Fikoremediasi Dalam Menunjang Ketahanan Pangan: Peluang Dan Tantangan*. Seminar Nasional Biologi 2013. Jurusan Biologi FSM. UNDIP. Semarang.
- Soeprbowati dan Hariyati. 2013. *Bioaccumulation of Pb, Cd, Cu, and Cr by Porphyridium cruentum (S.F. Gray) Nägeli*. International Journal of Marine Science 2013, Vol.3, No.27, 212-218 (doi: 10.5376/ijms.2013.03.0027)
- Vonshak, A. 1997. *Spirulina: growth, physiology and biochemistry*. In *Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology*. Vonshak, A. (Ed.), Taylor & Francis, London.
- Soong, P. 1980. *Production and Development of Chlorella and Spirulina in Taiwan*. pp: 77-113. In: G. Shelef and Soeder (Eds.). *Algal Biomass* Elsevier, Amsterdam.