チューブ型フォトバイオリアクターを用いた微細藻類 による CO2 固定化技術の開発[※]

鴫原亜土·三宅友香·増田正夫·増田篤稔*1

Development of CO₂ Fixation Technology by Cultivated Microalgae Using Tubular Photobioreactor

Ado Shigihara • Tomoka Miyake • Masao Masuda • Atsunori Masuda

建物居室内における CO₂濃度は、通常の呼気由来に加え昨今の大気中 CO₂濃度の上昇に伴 い増加傾向にある。濃度基準である 1000ppm を超過すると、倦怠感や眠気等の症状が増える ことから、労働者の判断能力や集中力低下に著しく影響をおよぼす可能性がある。そこで、優 れた光合成能を持つ微細藻類とチューブ型フォトバイオリアクターを用いて居室内の CO₂ を 生物固定し、低濃度化するシステムを試作し、特に培養に関する基礎的な検討を行った。その 結果、濁度の増加と共に CO₂ 固定量の指標であるリアクター入口・出口の気相 CO₂濃度差と CO₂ 固定速度との間には正の相関が見られ、確実に生物固定されていることが示された。ま た、培養から収穫までのバッチ試験を繰り返し行ったところ、試験を重ねる毎に微細藻類の増 殖は鈍化し倍加時間は増加傾向を示したが、当初目標としていた 3 ヶ月間にわたる長期連続 培養を達成することができた。

1. はじめに

我が国では、建物居室内の空気質の管理指標の一つとして二酸化炭素(CO₂)濃度が用いられている。そ の濃度基準値は「建築物における衛生的環境の確保に関する法律(建築物衛生法、1970年公布)」により、 1000pm 以下と定められており¹⁾、これを維持するのに必要な換気量の算出は、人の代謝により体外に放 出される CO₂ 量と大気中の CO₂濃度を基に行われている²⁾。しかしながら、2023年時点における大気中 CO₂の世界平均濃度は約420pmと高く、産業革命前に280pm程度だった CO₂濃度は現在年間 2pm以上 の速度で増加している³⁾。それ故に、多くの人が集う会議室のような気密性の高い空間に適切な換気量が設 定されていなければ、建物居室内の CO₂濃度は容易に基準値を超過する。高濃度 CO₂環境下では倦怠感や 眠気が誘発されることが報告されており、業務パフォーマンス等に著しく影響を及ぼす可能性がある⁴⁰。 一方で、換気量を増やすことはエネルギー消費の増大に直接つながることから、大気中 CO₂濃度を下げる べく、これを回収・固定するための技術開発が物理化学的(たとえば固体材料による吸着³⁾やアミン溶液に よる吸収³⁾ 或いは生物学的な方法(たとえば高等植物⁹⁾や微細藻類の光合成による固定¹⁰)を採用して行 われている。特に微細藻類は陸上植物に比べおよそ 10~50 倍の CO₂固定能を持ち¹¹⁾、式(1)に示す光合成 反応によれば、電子供与体として水を用いることで酸素(O₂)を放出させるだけでなく、付加価値の高い 炭水化物(CH₂O)を生産する特徴を有する¹²。

$$CO_2 + H_2O + 8 \text{ photons} \rightarrow (CH_2O)_n + O_2$$
 (1)

高砂熱学イノベーションセンター報 No.38 2024.

[※]本論文は、化学工学会第89年会講演論文を加筆修正したものである。

^{*1} 玉川大学農学部



図1 システム概要図

また、CO₂固定に伴い生成された豊富なO₂を含む空気は換気を目的に、例えばエアハンドリングユニットを介して建物居室へ導入することができる¹³⁾。したがって、建物居室空気由来のCO₂を高効率に回収・ 濃縮し、次いで藻類を使用した生物固定システムに供することによりO₂リッチ/低CO₂濃度空間を創出で きれば、環境配慮型社会に適した資源循環が生まれると考えられる(図1)。

本研究は、オフィス労働者の生産性・ウェルネス向上及びカーボンネガティブを両立する建築設備の 開発を最終目的としているが、現況の技術課題としては3つ、すなわち(1)微細藻類の長期安定培養、(2)建 物居室空気中の CO2吸脱着および(3)CO2固定した藻体の有効利用法の検討が挙げられる。ここでは特に(1) にフォーカスし、高効率に CO2を固定する微細藻類と独自設計したチューブ型フォトバイオリアクター (TPBR)を用いて、3ヶ月の長期運転を目標に、屋外環境下における微細藻類の連続培養および固定化技 術の確立に必要な基礎データの取得およびその解析を行った。本稿では、培養状況を長期間にわたりモニ タリングした結果を基に、微細藻類の生長速度や CO2固定速度等の評価を行い、併せて現状の課題につい ても整理したので報告する。

2. 試料と方法

2.1 微細藻類株

供試微細藻類には、様々な環境下において培養可能な Chlorella sp.株を採用した。加えて、光補償点が低く強い光を要しないことや培養時の発泡性が少なく大量培養に適しているといった優れた能力を有する。 実験に必要な量の藻類培養液を確保するため、種藻の培養はオートクレーブにより滅菌処理した MC+培地 (窒素、リン、硫黄およびマグネシウムを主成分とする緑藻の増殖に特化した培地)¹⁴⁾を用いて行い、LED 照射下で滅菌フィルターを介した空気を供給しながら段階的にアップスケーリングした。

2.2 TPBR の製作

微細藻類の培養方法は、開放型であるオープンポンド方式やレースウェイ方式および閉鎖型である管状 方式に大別され、各方式についてシステム設計に関する研究開発が行われている¹⁵⁻¹⁷⁾。本研究で採用した TPBR は閉鎖型藻類培養システムの一種で、開放型システムに比べ雑菌等のコンタミネーションや培養液 蒸散の抑制に優れており、屋外安定培養技術の構築に適している¹⁸⁾。さらに、培養液体積当たりの受光面 積の比率を高くし CO₂の吸収経路を長くすることで高密度培養が可能となり、光合成による CO₂ 固定量を 飛躍的に向上させることができる。



製作した TPBR(培養液体積:約300L)は、主に多段式ガラス管(外径:54mm、長さ:165m)、循環 ポンプ、栄養剤タンク、水質監視タンク(入口/出口)及び膨張タンクから構成されており、高砂熱学イノ ベーションセンターの藻類池棟(温室)に設置した(**図2**)。棟内の温湿度、光環境および培養液の水温に ついては特別な制御を行わず、太陽光の明暗サイクル及び気象現象による自然変動とした。

TPBRを構成するタンク内には、培養状況を監視する目的で**図2**に示す各種センサーを設置した。セン サーから得られた連続データは、プログラマブル・ロジック・コントローラー (PLC)により収集・記録さ れ、制御プログラムに基づいて、培養から収穫までを繰り返すサイクル運転が可能となっている。また、 運転が長期にわたるとガラス管内にバイオフィルムが付着し、それが原因で光の透過性が著しく低下する ため、図示はしていないが管内洗浄機構を備えている。

2.3 TPBR による微細藻類の培養

TPBR と微細藻類による CO₂固定化に関する実験は、2024 年 1 月から 3 月にかけて行った。培養システ ムの運転開始前には、所定の初期濁度となるように一定量の種藻と純水を TPBR に投入した。次いでホウ 素や鉄に代表される必須微量元素を含む液肥(窒素:リン:カリウム=6:10:5)を一定量添加し、これを 培養液とした。建物居室空気中の CO₂の回収・濃縮によって得られる濃度を模した CO₂-空気混合ガス(約 4%(v/v),入口濃度,CO₂-inlet)を日の出から日の入り時刻まで培養液へ通気し、培養期間中は培養液の pH、 入口/出口溶存酸素濃度(DO-inlet/DO-outlet)、濁度及び水温の他、日射量や膨張タンク内の CO₂(出口 濃度, CO₂-outlet)を連続測定した。

2.4 微細藻類の生長測定

一般的に、微細藻類の増殖評価は細胞数の測定により行われるが、サンプリングを含め多くの手間や時間を要し、測定個人差も大きいという欠点がある。このため、バイオマス量の指標である藻体濃度と比例関係にある濁度を用いて、間接的に評価する手法が報告されている¹⁹⁻²⁰。**図3**に濁度(*T*, NTU)と藻体濃度(*N*, gL⁻¹)の関係を示す。ここで、藻体濃度はJISK 0102 14.1 にしたがい、培養液に含まれる懸濁物質として測定した²¹⁾。これらの間には強い正の相関が認められ(*r*=0.973)、式(2)に示す関係式を用いれば、水質監視タンク内に設置した濁度センサーより得た測定データを藻体濃度に換算することができる。



$$T = 1.032 \times N + 55.57 \tag{2}$$

また、微細藻類の増殖ポテンシャルを推定する上で重要なファクターとなる比増殖速度(μ, h⁻¹)は、式(3) を用いて算出した。

$$\mu = \frac{\ln\left(\frac{N_2}{N_1}\right)}{t_2 - t_1} \quad \Leftrightarrow \quad N_2 = N_1 e^{\mu(t_2 - t_1)} \tag{3}$$

ここで、 N_1 および N_2 はそれぞれ対数増殖期における時刻 t_1 (h)および t_2 (h)で測定した藻体濃度(gL⁻¹)であり($N_2 > N_1, t_2 > t_1$)、培養条件が一定の範囲内にある場合、藻体濃度は上式の通り指数的に増加する²²⁾。なお、上式において藻体濃度が2倍、すなわち $N_2/N_1=2$ となるのに要する時間を倍加時間(t_d , h)とすると、これを式(4)で表すことができる。

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0.693}{\mu}$$
(4)

微細藻類のバイオマス生産能力(PBiomass, gL⁻¹d⁻¹)は、式(5)のように表すことができる。

$$P_{Biomass} = \frac{N_t - N_0}{t - t_0} \tag{5}$$

ここで、 N_t および N_0 はそれぞれ培養時間t(d)および培養初期時間 $t_0(d)$ で測定した藻体濃度(gL^{-1})である。 また、 CO_2 固定量(F_{CO2} , g)と CO_2 固定速度(FR_{CO2} , $gL^{-1}d^{-1}$)は、それぞれ式(6)と式(7)を用いて算出した²³⁾。

$$F_{CO_2} = (N_t - N_0) \times f_C \times V \times \left(\frac{M_{CO_2}}{M_C}\right)$$
(6)

$$FR_{CO_2} = P_{Biomass} \times f_C \times \left(\frac{M_{CO_2}}{M_C}\right) \tag{7}$$

ここで、*V*は TPBR の容積(L)、 f_c は元素分析計で測定した藻体中の炭素含有率(%, w/w)、 M_{co2} および M_c はそれぞれ CO₂および炭素の分子量(g mol⁻¹)である。なお、CO₂固定効率(E_{co2} ,%)は、式(6)により得られた *F*co2 と TPBR に供給された CO₂量(m_{co2} , g)との比から、式(8)のように評価した。

$$E_{CO_2} = \left(\frac{F_{CO_2}}{m_{CO_2}}\right) \times 100 \tag{8}$$

3. 結果と考察

3.1 微細藻類の生長および CO2 固定

図4に、微細藻類の培養期間中におけるモニタリングデータの経時変化の一例 を示す(2024年1月12日~1月24日)。 日中のCO2通気時間帯において、培養液のpHは気液二相流に伴うCO2の自然溶 解により中性域付近まで低下しており

(図 4F)、この領域では化学平衡論により 溶解した CO₂のおよそ 80%程度が重炭酸 イオン(HCO₃・)として存在する。一般的 に、微細藻類は光合成時に HCO₃・を炭素 源として細胞内に取り込み増殖するため ²⁴⁾、藻体濃度の指標である濁度は降水が 観測された培養 8~10 日目を除き、日射 による水温上昇も寄与して増加傾向を示 した(図 4C, 4D および 4F)。また、濁度 の増加に伴い培養液中の DO 濃度も徐々 に増加しており、TPBR の入口および出口 間の DO 濃度差(ΔC_{02} =DO-inlet-DOoutlet)が大きくなる時間帯は、太陽放射 量が最も高くなる時間帯と一致した(図 4E)。

図 4A は TPBR の入口および出口におけ る気相 CO2の濃度変化を示しているが、 これらの濃度差 (ACco2=CO2-inlet-CO2outlet) は微細藻類に吸収された CO₂ 量に 等しい²⁵⁾。微細藻類の生長が速く藻体濃 度も増加したため、培養期間中の平均 △C_{CO2}は 2.1% (v/v) と大きく、通気濃度 に対して約 53%の CO2 が吸収された。 Chiu らは、本研究とは異なる Chlorella sp. を使用した連続培養における CO2 吸収率 を調査しており、2、5、10および15%(v/v) CO₂の通気でそれぞれ 58、27、20 および 16%であったと報告している²⁶⁾。このこ とは、通気濃度が低いほど微細藻類への 吸収がよく行われることを意味してお り、本システムを設計する上で重要なフ ァクターとなる。また、CO2の通気時間帯 に限定すると、藻体濃度を基に計算した



図4 培養期間中の気相 CO2濃度(A)、CO2固定速度(B)、CO2固定率 および太陽放射(C)、培養液の水温(D)、培養液中の DO 濃度 (E)、培養液中の濁度および pH(F)の変化 CO₂ 固定速度(図 4B) と *Δ*C_{CO2} との間には正の相関が認めら れることから(*r*=0.858)、今後実験を計画している居室空気 中から回収・濃縮した CO₂ を用いた場合についても、支障な く生物固定できると考えられる(図 5)。

一方、TPBR への CO₂ 通気流量と藻体濃度を基に計算した CO₂固定効率は、最も細胞分裂が進行する対数増殖期において も約 18%と低く(**図 4C**)、先に述べた CO₂吸収率との差は大 きい。これらは、TPBR の設計仕様や供給 CO₂ 濃度だけでな く、培養液に対する CO₂の溶解方法にも依存するため²⁷⁾、最 適な培養条件を今後見出す必要がある。

3.2 長期培養による生長への影響

微細藻類は、誘導期、対数増殖期および定常期と呼ばれる3 つの成長段階を経て増殖するが²⁸⁾、濁度の増加に伴い光が TPBRのガラス管内部に届き難くなるため、定常期における細



図5 CO2 固定速度と気相 CO2 濃度差の関係

胞増殖は減速する。実際、濁度が 1800 程度に達した以降の生長は鈍化し、CO₂ 固定速度や CO₂ 固定効率は 抑制された(図 4B, 4C および 4F)。このため、TPBR から増殖した微細藻類の一定量を収穫し、培養初期の 濁度となるようにフレッシュな培養液を加えることでバッチ試験を繰り返し行い、生長速度への影響を調 査した。

バッチ試験の繰り返しによる藻体濃度の変化(増殖曲線)および比増殖速度と倍加時間の変化をそれぞ れ図 6A および図 6B に示す。試験回数を重ねる毎に対数増殖期間は短くなり、試験終了時における藻体濃 度は試験開始時のそれに比べ約 80%減少した。また、比増殖速度も低下するため、これを基に計算される 倍加時間は約 1.7 倍まで増加したが、当初の目的としていた 3 ヶ月間の長期連続培養を達成することがで きた。

このような増殖曲線の変動は、微細藻類の壁面付着成長、低活性細胞や死細胞の沈着(バイオフィルム)、 試験の不確実性などに起因する²⁹⁾。本システムは年間を通じての運用を想定しているが、培養の長期化は 上記リスクを増大させることから、連続データの傾向を踏まえ、薬品による定期的な TPBR の殺菌あるい は培養液自体の総入れ替えが必要となる。



図 6 バッチ試験における藻体濃度(A)と比増殖速度および倍加時間(B)の変化 (図 6A 中の番号はバッチ試験回数を表す)

3.3 今後の課題

本研究では屋外培養実験の他に、ジャーファーメンターと LED 光源を使用したラボ実験により微細藻類の基本特性調査を行っている。ラボ実験でこれまでに観測された倍加時間は、屋外培養実験のそれに比べ約1/10と大幅に短く、この時間差は CO2 固定量の増加を目指す上で大きな障害となる。これを解消すべく、これまでに得たデータを基に微細藻類の能力を最大限に引き出す TPBR の改良と培養条件についてコスト面も含めて検討を行う必要がある。また、出口戦略として、濁度上昇に伴って収穫により TPBR から排出される多量の微細藻類の活用候補先についても、調査を行う予定である。

4. おわりに

本稿では、オフィス労働者の生産性・ウェルネス向上及びカーボンネガティブを両立する建築設備の開 発を念頭に、優れた光合成能を持つ微細藻類と独自設計した TPBR を用いて、屋外における連続培養およ び CO₂ 固定化技術の確立に必要な基礎データの取得およびその解析を行った。その結果、TPBR に供給さ れた CO₂ は微細藻類の生長に使用されており、CO₂吸収量と CO₂ 固定速度との間には正の相関が認められ ることから、居室空気中から回収・濃縮した CO₂についても効率よく生物固定できると考えられる。また、 培養から収穫までのバッチ試験を繰り返し行ったところ、試験を重ねる毎に微細藻類の対数増殖期間は短 くなり、藻体濃度の上限値も徐々に減少した。微細藻類の活性度が減少したことにより、倍加時間は初期 状態に比べ 1.7 倍まで増加したが、CO₂の生物固定は継続して行われ、当初目標としていた3ヶ月間にわた る長期連続培養を達成した。また、別途開発中の CO₂吸脱着システムを組み合わせると、本システムは酸 素リッチ/低 CO₂濃度環境を必要とする建物、例えば教育機関やホテルなどへのニーズが期待できる。

以上より、微細藻類を用いた CO₂ 固定化技術の確立の可能性が見出されたが、CO₂ 固定量を増やす培養 条件の探索や収穫した藻類の利用先調査など技術的な課題は多い。今後は、本システムの社会ニーズに沿 った開発と展開を進めていきたいと考えている。

文 献

- 1) 東賢一: 室内環境中における二酸化炭素の吸入曝露によるヒトへの影響, 室内環境, 21(2), 113-120(2018).
- 2) 公益社団法人空気調和・衛生工学会:室内空気質のための必要換気量,換気設備委員会・室内空気質小委員会委員 会成果成果報告書参考資料 4(2016).
- 3) 気象庁 HP: <u>https://ds.data.jma.go.jp/ghg/kanshi/ghgp/co2_trend.html</u>
- 4) 高橋正好:二酸化炭素と人体,安全工学,37(5),352-357(1998).
- 5) Allen J. G., MacNaughton P., Satish U., Santanam S., Vallarino J., Spengler J.D.: Associations of cognitive function scores with carbon dioxide, ventilation, and volatile organic compound exposures in office workers: A controlled exposure study of Green and Conventional office environments, Environ. Health Perspect., 124(6), 805-812(2016).
- 6) 小崎智照,松澤七海,百岳香奈:高濃度の二酸化炭素が覚醒と精神作業能へ与える影響,人間工学,58(2),76-83(2 022).
- Wang J., Huang L., Yang R., Zhang Z., Wu J., Gao Y., Wang Q., O'Hare D., Zhong Z.: Recent advances in solid sorbents for CO₂ capture and new development trends. Energy Environ. Sci. 7(11), 3478–3518(2014).
- Ooi Z.L., Tan P.Y., Tan L.S., Yeap S.P.: Amine-based solvent for CO₂ absorption and its impact on carbon steel corrosion: A perspective review. Chin. J. Chem. Eng. 28(5), 1357–1367(2020).
- 9) Shishegaran A., Shishegaran A., Najari M., Ghotbi A., Boushehri A.N.: Effect of plants on an environment with high carbon dioxide concentration. Cleaner Eng. Technol. 1, 100002(2020).
- Alami A.H., Alasad S., Ali M., Alshamsi M.: Investigating algae for CO₂ capture and accumulation and simultaneous production of biomass for biodiesel production. Sci. Total Environ. 759, 143529(2021).

- Batista A.P., Ambrosano L., Graça S., Sousa C., Marques P.A., Ribeiro B., Botrel E.P., Neto P.C., Gouveia L.: Combining urban wastewater treatment with biohydrogen production-an integrated microalgae-based approach. Bioresour. Technol. 184, 230– 235(2015).
- 12) Do C.V.T., Dinh C.T., Dang M.T., Tran T.D., Le T.G.: A novel flat-panel photobioreactor for simultaneous production of lutein and carbon sequestration by Chlorella sorokiniana TH01. Bioresour. Technol. 345, 126552(2022).
- Mata T.M., Oliveira G.M., Monteiro H., Silva G.V., Caetano N.S., Martins A.A.: Indoor air quality improvement using naturebased solutions: Design proposals to greener cities. Int. J. Environ. Res. Public Health 18, 8472(2021).
- 14) 瀧本善之, 村上仁一, 山田文博: 特開平 10-155478(1998).
- 15) Borowitzka M.A.: Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. J. Biotechnol. 70, 313-321(1999).
- 16) Richardson J.W., Johnson M.D., Outlaw J.L.: Economic comparison of open pond raceways to photo bio-reactors for profitable production of algae for transportation fuels in the Southwest. Algal Res. 1, 93-100(2012).
- 17) Rebolloso Fuentes M.M., Garcia Sánchez J.L., Fernández Sevilla J.M., Acién Fernandez F.G., Sánchez Pérez J.A., Molina Grima E.: Outdoor continuous culture of Porphyridium cruentum in a tubular photobioreactor: quantitative analysis of the daily cyclic variation of culture parameters. J. Biotechnol. 70, 271–288(1999).
- 18) 宮下英明, 荒谷彰吾, 井村綾子, 沈元, 石井健一郎, 神川龍馬: 次世代微細藻類バイオマス生産法とそれに適した 微細藻類の収集・選抜, 日本エネルギー学会機関紙えねるみくす, 96, 40-49(2017).
- Thoré E.S.J., Schoeters F., Spit J., Van Miert S. Real-time monitoring of microalgal biomass in pilot-scale photobioreactors using Nephelometry. Processes 9, 1530(2021).
- Binh T.N., Bruce E.R.: Low-cost optical sensor to automatically monitor and control biomass concentration in microalgal cultivation. Algal Res. 32, 101-106(2018).
- 21) 工業用水・工場排水試験方法-第1部一般理化学試験方法 JIS K 0102-1 14.1, (2021).
- 22) 小西正朗, 堀内淳一:細胞の増殖を捉える-計測法から比速度算出まで-, 生物工学会誌, 93(3), 149-152(2015).
- 23) Do C.V.T., Nguyen N.T.T., Tran T.D., Pham M.H.T., Pham T.Y.T.: Capability of carbon fixation in bicarbonate-based and carbon dioxide-based systems by Scenedesmus acuminatus TH04. Biochem. Eng. J. 166, 107858(2021).
- Politaeva N.; Ilin I.; Velmozhina K.; Shinkevich P.: Carbon dioxide utilization using chlorella microalgae. Environments 10, 109(2023)
- 25) Fei T., Lin L., Li X., Yang J.-Y., Zhao J., Liu, L.: Modeling effect of bubbles on time-dependent radiation transfer of microalgae in a photobioreactor for carbon dioxide fixation. Photonics 9, 864(2022).
- 26) Chiu S.Y., Kao C.Y., Chen C.H., Kuan T.C., Ong S.C., Lin C.S.: Reduction of CO₂ by a high-density culture of *Chlorella sp.* in a semicontinuous photobioreactor. Bioresour. Technol. 99, 3389–3396(2008).
- Cheng L., Zhang L., Chen H., Gao C.: Carbon dioxide removal from air by microalgae cultured in a membrane-photobioreactor. Sep. Purif. Technol. 50, 324–329(2006).
- 28) Price K., Farag I.H.: Resources conservation in microalgae biodiesel production. Int. J. Eng. Tech. Res. 1(8), 49-56(2013).
- 29) Schoeters F., Spit J., Swinnen E., Cuyper A.D., Vleugels R., Noyens I., Miert S.V.: Pilot-scale cultivation of the red alga *Porphyridium purpureum* over a two-year period in a greenhouse. 35, 2095-2109(2023).

ABSTRACT

The concentration of CO_2 in building occupancies has been increasing owing to the recent rise in atmospheric CO_2 levels, in addition to the usual exhaled CO_2 . If the concentration exceeds 1000 ppm, symptoms such as fatigue and drowsiness increase, which may significantly affect the decision-making and concentration abilities of the workers. Therefore, a prototype system for the biological fixation and reduction of CO_2 concentration in living spaces using microalgae with excellent photosynthetic ability and a tube-type photo-bioreactor was developed, and basic studies were conducted, particularly regarding cultivation. The results showed a positive correlation between the CO_2 fixation rate and the difference in gas-phase CO_2 concentration at the inlet and outlet of the reactor, indicating the amount of CO_2 fixed, as well as an increase in turbidity, confirming that the CO_2 was biologically fixed. Additionally, repeated batch tests from cultivation to harvest showed that the growth of microalgae slowed down and the doubling time increased with each successive test. Nevertheless, the initial goal of long-term continuous cultivation over three months was achieved.