

(19) 日本国特許庁(JP)

## 再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02013/031252

発行日 平成27年3月23日(2015.3.23)

(43) 国際公開日 平成25年3月7日(2013.3.7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C12P 3/00 (2006.01)</b>	C12P 3/00 Z	4B064
<b>C02F 3/34 (2006.01)</b>	C02F 3/34 ZABZ	4D004
<b>B09B 3/00 (2006.01)</b>	B09B 3/00 304Z	4D040

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 43 頁)

出願番号 特願2013-531113 (P2013-531113)	(71) 出願人 599016431 学校法人 芝浦工業大学 東京都江東区豊洲3丁目7番5号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2012/052922	
(22) 国際出願日 平成24年2月9日(2012.2.9)	
(31) 優先権主張番号 特願2011-191309 (P2011-191309)	(74) 代理人 110000109 特許業務法人特許事務所サイクス
(32) 優先日 平成23年9月2日(2011.9.2)	
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	(72) 発明者 山下 光雄 東京都江東区豊洲3丁目7番5号 学校法人芝浦工業大学内
	Fターム(参考) 4B064 AA04 CA02 CB16 CC06 CC07 DA16 4D004 AA41 AA50 AB05 BA10 CA13 CA40 CA41 CC12 4D040 DD03 DD11
	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 セレンの回収方法

## (57) 【要約】

本発明の目的は、微生物を用いて、排水・廃棄物などから固体セレン又は気体セレンを効率的に回収する方法を提供することである。本発明によれば、水溶性セレン化合物を含む試料を、水溶性セレン化合物を還元して元素態セレン又は気体セレンを生成できる能力を有する微生物と、温度が35 を超えて40 以下及びpH 7.0 ~ 9.4 の条件下で接触させることにより水溶性セレン化合物を還元して元素態セレン又は気体セレンを生成させることを含む、セレンの回収方法が提供される。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

水溶性セレン化合物を含む試料を、水溶性セレン化合物を還元して元素態セレン又は気体セレンを生成できる能力を有する微生物と、温度が 35 を超えて 40 以下及び pH 7 . 0 ~ 9 . 4 の条件下で接触させることにより水溶性セレン化合物を還元して元素態セレン又は気体セレンを生成させることを含む、セレンの回収方法。

## 【請求項 2】

水溶性セレン化合物を還元して元素態セレン又は気体セレンを生成できる能力を有する微生物が、好気性微生物である、請求項 1 に記載のセレンの回収方法。

## 【請求項 3】

水溶性セレン化合物を還元して元素態セレン又は気体セレンを生成できる能力を有する微生物が、Pseudomonas 属細菌である、請求項 1 又は 2 に記載のセレンの回収方法。

## 【請求項 4】

水溶性セレン化合物を還元して元素態セレン又は気体セレンを生成できる能力を有する微生物が、Pseudomonas stutzeri である、請求項 1 から 3 の何れか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 5】

水溶性セレン化合物を含む試料を、水溶性セレン化合物を還元して元素態セレン又は気体セレンを生成できる能力を有する微生物としての Pseudomonas stutzeri NT-1 株 ( 受託番号 N I T E B P - 6 8 5 ) と温度 35 ~ 40 及び pH 7 . 0 ~ 9 . 4 の条件下で接触させることにより水溶性セレン化合物を還元して元素態セレン又は気体セレンを生成させることを含む、セレンの回収方法。

## 【請求項 6】

水溶性セレン化合物がセレン酸又は亜セレン酸である、請求項 1 から 5 の何れか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 7】

水溶性セレン化合物を含む試料を、水溶性セレン化合物を還元して元素態セレン又は気体セレンを生成できる能力を有する微生物と通気条件下において接触させる、請求項 1 から 6 の何れか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 8】

通気条件が 1 L / 分 ~ 5 L / 分である、請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 9】

水溶性セレン化合物を含む試料を、水溶性セレン化合物を還元して元素態セレン又は気体セレンを生成できる能力を有する微生物と、通気条件下において接触させた後に、通気を停止した条件下で接触させる、請求項 7 又は 8 に記載の方法。

## 【請求項 10】

水溶性セレン化合物を含む試料を水溶性セレン化合物を還元して元素態セレン又は気体セレンを生成できる能力を有する微生物と攪拌条件下において接触させる、請求項 1 から 9 の何れか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 11】

攪拌条件が、250 rpm 以下の攪拌速度である、請求項 10 に記載の方法。

## 【請求項 12】

水溶性セレン化合物を含む試料中におけるセレン濃度が 100 ~ 6000  $\mu\text{mol} / \text{L}$  である、請求項 1 から 11 の何れか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 13】

水溶性セレン化合物を含む試料が、セレン含有材料を前処理することにより得られる試料である、請求項 1 から 12 の何れか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 14】

水溶性セレン化合物を含む試料が、セレン含有材料を無機酸に溶解することにより得られる試料である、請求項 13 に記載の方法。

## 【請求項 15】

10

20

30

40

50

水溶性セレン化合物を含む試料が、セレン含有材料を無機酸に溶解し、次いでアルカリ水溶液で中和することにより得られる試料である、請求項 1 3 又は 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

セレン含有材料が、銅 (Cu)、インジウム (In)、及びセレン (Se) を含む材料である、請求項 1 3 から 1 5 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 7】

セレン含有材料が、銅 (Cu)、インジウム (In)、ガリウム (Ga) 及びセレン (Se) を含む材料である、請求項 1 3 から 1 6 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 8】

セレン含有材料が、パネル材料である、請求項 1 3 から 1 7 の何れか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 1 9】

セレン含有材料が、太陽電池パネルである、請求項 1 3 から 1 8 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 0】

銅 (Cu)、インジウム (In)、及びセレン (Se) を含む材料を前処理することにより得られる水溶性セレン化合物を含む試料を、水溶性セレン化合物を還元して元素態セレン又は気体セレンを生成できる能力を有する微生物と接触させることにより水溶性セレン化合物を還元して元素態セレン又は気体セレンを生成させることを含む、セレンの回収方法。

【請求項 2 1】

水溶性セレン化合物を還元して元素態セレン又は気体セレンを生成できる能力を有する微生物が、好気性微生物である、請求項 2 0 に記載のセレンの回収方法。

20

【請求項 2 2】

水溶性セレン化合物を還元して元素態セレン又は気体セレンを生成できる能力を有する微生物が、Pseudomonas 属細菌である、請求項 2 0 又は 2 1 に記載のセレンの回収方法。

【請求項 2 3】

水溶性セレン化合物を還元して元素態セレン又は気体セレンを生成できる能力を有する微生物が、Pseudomonas stutzeri である、請求項 2 0 から 2 2 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 4】

水溶性セレン化合物を還元して元素態セレン又は気体セレンを生成できる能力を有する微生物が、Pseudomonas stutzeri NT-1 株 (受託番号 N I T E B P - 6 8 5 ) である、請求項 2 0 から 2 3 の何れか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 2 5】

銅 (Cu)、インジウム (In)、及びセレン (Se) を含む材料が、更にガリウム (Ga) を含む材料である、請求項 2 0 から 2 4 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 6】

水溶性セレン化合物を含む試料が、銅 (Cu)、インジウム (In)、及びセレン (Se) を含む材料を無機酸に溶解することにより得られる試料である、請求項 2 0 から 2 5 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 7】

水溶性セレン化合物を含む試料が、銅 (Cu)、インジウム (In)、及びセレン (Se) を含む材料を無機酸に溶解し、次いでアルカリ水溶液で中和することにより得られる試料である、請求項 2 0 から 2 6 の何れか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 2 8】

銅 (Cu)、インジウム (In)、セレン (Se) 及びガリウム (Ga) を含む材料を無機酸に溶解し、次いでアルカリ水溶液で中和することにより、沈殿物として銅 (Cu) 及びインジウム (In) を回収し、上清としてセレン (Se) 及びガリウム (Ga) を回収し、次いでセレン (Se) 及びガリウム (Ga) を含む上記上清を、水溶性セレン化合物を還元して元素態セレン又は気体セレンを生成できる能力を有する微生物と接触させることにより水溶性セレン化合物を還元して元素態セレンを沈殿物として回収し、ガリウム (Ga) を上清として回収することを含む、銅 (Cu)、インジウム (In)、セレン (Se) 及びガリウム (Ga) の回収

50

方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、微生物を用いた排水・廃棄物などからのセレンの回収方法に関する。

【背景技術】

【0002】

日本は、世界最大のセレン生産国であり、その80%を輸出している。セレン生産は主に銅精錬時に生じる銅電解スライムからの副産物として得られる。生産されたセレンは、ガラス、顔料、化学分野などで用いられ、最終的に水系に6 tが排出されているといわれている。水中での存在形態であるオキサニオン、すなわちセレン酸塩および亜セレン酸塩は、生物に対して慢性・急性の毒性を有することから、0.1 mg/Lという厳しい一律排水基準が設定されている。現在、排水は凝集沈殿法や、キレート処理法により浄化処理されているが、コストが高いという問題もある。これらの方法は資源の消費も大きく、含量が低いことから化学泥等よりセレンを資源として回収することもできない。

10

【0003】

*Pseudomonas stutzeri*を用いたセレン酸及び亜セレン酸の還元については非特許文献1に記載されている。また、本発明者らは、セレン化合物の生物学的処理方法の開発を目指して、*Pseudomonas stutzeri* NT-1株を単離した(特許文献1)。*Pseudomonas stutzeri* NT-1株は、セレン酸を亜セレン酸に効率的に還元し、さらに亜セレン酸を元素態セレンへ還元する能力を有する。元素態セレンは水に不溶性であり、無毒であるので、*Pseudomonas stutzeri* NT-1株を使用すれば、比較的安価に、セレン化合物を含有する廃水などを無毒化し、そこからセレンを回収して再利用できる可能性がある。微生物を利用したセレン化合物の処理およびセレンの回収をより効率的に行うためには、処理条件の検討や設備の開発が必要である。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】特開2010-142166号公報

【非特許文献】

30

【0005】

【非特許文献1】L.Lortie et al., Applied and Environmental Microbiology, 58(12), 1992, p.4042-4044

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明の課題は、微生物を用いて、排水・廃棄物などから固体セレン又は気体セレンを効率的に回収する方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0007】

40

本発明者は上記課題を解決すべく、ジャーファーマンターを用いた培養系による、セレン含有排水や廃棄物からのセレン回収実験を行った。そして、セレンを含む実排水や実廃棄物の前処理方法(希釈方法、投入時間、溶解方法、中和方法)、固体セレンまたは気体セレン回収のための培養方法、後処理方法(酸溶解、活性炭吸着、遠心分離)を検討した。その結果、*Pseudomonas stutzeri* NT-1株を用いて所定の条件で排水・廃棄物を処理することによって、セレンを効率的に回収できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0008】

すなわち、本発明の態様は以下に関する。

(1) 水溶性セレン化合物を含む試料を、水溶性セレン化合物を還元して元素態セレン

50

又は気体セレンを生成できる能力を有する微生物と、温度が35を超えて40以下及びpH7.0~9.4の条件下で接触させることにより水溶性セレン化合物を還元して元素態セレン又は気体セレンを生成させることを含む、セレンの回収方法。

(2) 水溶性セレン化合物を還元して元素態セレン又は気体セレンを生成できる能力を有する微生物が、好気性微生物である、請求項1に記載のセレンの回収方法。

(3) 水溶性セレン化合物を還元して元素態セレン又は気体セレンを生成できる能力を有する微生物が、Pseudomonas属細菌である、請求項1又は2に記載のセレンの回収方法。

(4) 水溶性セレン化合物を還元して元素態セレン又は気体セレンを生成できる能力を有する微生物が、Pseudomonas stutzeriである、請求項1から3の何れか1項に記載の方法。

(5) 水溶性セレン化合物を含む試料を、水溶性セレン化合物を還元して元素態セレン又は気体セレンを生成できる能力を有する微生物としてのPseudomonas stutzeri NT-1株(受託番号NITE BP-685)と温度35~40及びpH7.0~9.4の条件下で接触させることにより水溶性セレン化合物を還元して元素態セレン又は気体セレンを生成させることを含む、セレンの回収方法。

(6) 水溶性セレン化合物がセレン酸又は亜セレン酸である、(1)から(5)の何れか1項に記載の方法。

(7) 水溶性セレン化合物を含む試料を、水溶性セレン化合物を還元して元素態セレン又は気体セレンを生成できる能力を有する微生物と通気条件下において接触させる、(1)から(6)の何れか1項に記載の方法。

(8) 通気条件が1L/分~5L/分である、(7)に記載の方法。

(9) 水溶性セレン化合物を含む試料を、水溶性セレン化合物を還元して元素態セレン又は気体セレンを生成できる能力を有する微生物と、通気条件下において接触させた後に、通気を停止した条件下で接触させる、(7)又は(8)に記載の方法。

(10) 水溶性セレン化合物を含む試料を水溶性セレン化合物を還元して元素態セレン又は気体セレンを生成できる能力を有する微生物と攪拌条件下において接触させる、(1)から(9)の何れか1項に記載の方法。

(11) 攪拌条件が、250rpm以下の攪拌速度である、(10)に記載の方法。

(12) 水溶性セレン化合物を含む試料中におけるセレン濃度が100~6000µmol/Lである、(1)から(11)の何れか1項に記載の方法。

(13) 水溶性セレン化合物を含む試料が、セレン含有材料を前処理することにより得られる試料である、(1)から(12)の何れか1項に記載の方法。

(14) 水溶性セレン化合物を含む試料が、セレン含有材料を無機酸に溶解することにより得られる試料である、(13)に記載の方法。

(15) 水溶性セレン化合物を含む試料が、セレン含有材料を無機酸に溶解し、次いでアルカリ水溶液で中和することにより得られる試料である、(13)又は(14)に記載の方法。

(16) セレン含有材料が、銅(Cu)、インジウム(In)、及びセレン(Se)を含む材料である、(13)から(15)の何れか1項に記載の方法。

(17) セレン含有材料が、銅(Cu)、インジウム(In)、ガリウム(Ga)及びセレン(Se)を含む材料である、(13)から(16)の何れか1項に記載の方法。

(18) セレン含有材料が、パネル材料である、(13)から(17)の何れか1項に記載の方法。

(19) セレン含有材料が、太陽電池パネルである、(13)から(18)の何れか1項に記載の方法。

(20) 銅(Cu)、インジウム(In)、及びセレン(Se)を含む材料を前処理することにより得られる水溶性セレン化合物を含む試料を、水溶性セレン化合物を還元して元素態セレン又は気体セレンを生成できる能力を有する微生物と接触させることにより水溶性セレン化合物を還元して元素態セレン又は気体セレンを生成させることを含む、セレンの回

10

20

30

40

50

収方法。

(21) 水溶性セレン化合物を還元して元素態セレン又は気体セレンを生成できる能力を有する微生物が、好気性微生物である、(20)に記載のセレンの回収方法。

(22) 水溶性セレン化合物を還元して元素態セレン又は気体セレンを生成できる能力を有する微生物が、Pseudomonas属細菌である、(20)又は(21)に記載のセレンの回収方法。

(23) 水溶性セレン化合物を還元して元素態セレン又は気体セレンを生成できる能力を有する微生物が、Pseudomonas stutzeriである、(20)から(22)の何れか1項に記載の方法。

(24) 水溶性セレン化合物を還元して元素態セレン又は気体セレンを生成できる能力を有する微生物が、Pseudomonas stutzeri NT-1株(受託番号N I T E B P - 6 8 5)である、(20)から(23)の何れか1項に記載の方法。

(25) 銅(Cu)、インジウム(In)、及びセレン(Se)を含む材料が、更にガリウム(Ga)を含む材料である、(20)から(24)の何れか1項に記載の方法。

(26) 水溶性セレン化合物を含む試料が、銅(Cu)、インジウム(In)、及びセレン(Se)を含む材料を無機酸に溶解することにより得られる試料である、(20)から(25)の何れか1項に記載の方法。

(27) 水溶性セレン化合物を含む試料が、銅(Cu)、インジウム(In)、及びセレン(Se)を含む材料を無機酸に溶解し、次いでアルカリ水溶液で中和することにより得られる試料である、(20)から(26)の何れか1項に記載の方法。

(28) 銅(Cu)、インジウム(In)、セレン(Se)及びガリウム(Ga)を含む材料を無機酸に溶解し、次いでアルカリ水溶液で中和することにより、沈殿物として銅(Cu)及びインジウム(In)を回収し、上清としてセレン(Se)及びガリウム(Ga)を回収し、次いでセレン(Se)及びガリウム(Ga)を含む上記上清を、水溶性セレン化合物を還元して元素態セレン又は気体セレンを生成できる能力を有する微生物と接触させることにより水溶性セレン化合物を還元して元素態セレンを沈殿物として回収し、ガリウム(Ga)を上清として回収することを含む、銅(Cu)、インジウム(In)、セレン(Se)及びガリウム(Ga)の回収方法。

【発明の効果】

【0009】

本発明によれば、微生物を利用して排水・廃棄物を処理することによって、セレンを効率的に回収することができる。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】ジャーファーマンター培養におけるNT-1株のセレン酸および亜セレン酸の還元の経時変化(38℃、pH調整なし(初期pH7.0)、1 L/min、120rpm)

【図2】ジャーファーマンターを用いた増殖系におけるNT-1株の菌体数の経時変化(38℃、pH9.0、1 L/min、250rpm)

【図3】NT-1株の菌体数とO.D.<sub>600</sub>の関係

【図4】ジャーファーマンター培養におけるNT-1株のセレン酸還元の経時変化(38℃、pH調整なし(初期pH7.0)、1 L/min、120rpm)

【図5】ジャーファーマンター培養におけるNT-1株のセレン酸還元及び亜セレン酸還元反応に及ぼすpHの影響

【図6】ジャーファーマンター培養におけるNT-1株のセレン酸還元反応の最適pHの検討

【図7】ジャーファーマンター培養におけるNT-1株の亜セレン酸還元及びセレン酸還元反応に及ぼすpHの影響

【図8】ジャーファーマンター培養におけるNT-1株の亜セレン酸還元反応の最適pHの検討

【図9】ジャーファーマンター培養におけるNT-1株のセレン酸還元及び亜セレン酸還元反応に及ぼす温度の影響

【図10】ジャーファーマンター培養におけるNT-1株のセレン酸還元反応の最適温度の検討

【図11】ジャーファーマンター培養におけるNT-1株の亜セレン酸還元及びセレン酸還元反応に及ぼす温度の影響

10

20

30

40

50

- 【図12】ジャーファーマンター培養におけるNT-1株の亜セレン酸還元反応の最適温度の検討
- 【図13】ジャーファーマンター培養におけるNT-1株のセレン酸還元および増殖に及ぼす通気量の影響
- 【図14】ジャーファーマンター培養におけるNT-1株のセレン酸還元反応の通気量の検討
- 【図15】ジャーファーマンター培養におけるNT-1株のセレン酸還元および増殖に及ぼす攪拌速度の影響
- 【図16】ジャーファーマンター培養におけるNT-1株のセレン酸還元反応の攪拌速度の検討
- 【図17】ジャーファーマンター培養におけるNT-1株のセレン酸還元反応の攪拌速度と溶存酸素(DO)の関係 10
- 【図18】ジャーファーマンター培養におけるNT-1株の亜セレン酸還元および増殖に及ぼす通気量の影響
- 【図19】ジャーファーマンター培養におけるNT-1株の亜セレン酸還元反応の攪拌速度と溶存酸素(DO)の関係
- 【図20】通気による亜セレン酸還元への影響
- 【図21】ジャーファーマンター培養におけるNT-1株の最適条件での還元
- 【図22】通気による元素態セレン減少への影響
- 【図23】ジャーファーマンター培養時の気相部のGC-MS結果
- 【図24】DMDSeおよびDMDSの平衡反応後のGC-MSによる測定結果、A:トータルイオンクロマト、B:DMDS(MW:94)、DMDSe(MW:142)、DMSSe(MW:190)でフィルタリング 20
- 【図25】還元最適条件における各相のセレン濃度変化
- 【図26】活性炭による気体セレンの回収(38℃、pH9.0、1 L/min、250rpm、48h)
- 【図27】高濃度固体セレンの回収の検討
- 【図28】排水からの固体回収、38℃、pH9、250rpm、0 L/min(12hまでは1 L/min)
- 【図29】排水からの気体回収、38℃、pH9、250rpm、1 L/min
- 【図30】溶液試料1からの固体回収、38℃、pH9、250rpm、0 L/min(12hまでは1 L/min)
- 【図31】溶液試料1からの固体回収時における硝酸・亜硝酸濃度の変化、38℃、pH9、250rpm、0 L/min(12hまでは1 L/min) 30
- 【図32】中和溶液試料からの固体回収、38℃、pH9、250rpm、0 L/min(12hまでは1 L/min)
- 【図33】溶液試料1からの気体回収、38℃、pH9、250rpm、1 L/min
- 【図34】溶液試料1からの気体回収時における硝酸・亜硝酸濃度の変化、38℃、pH9、250rpm、1 L/min
- 【図35】溶液試料2からの気体回収、38℃、pH9、250rpm、1 L/min
- 【図36】中和溶液試料からの気体回収、38℃、pH9、250rpm、1 L/min
- 【図37】Seを含む廃棄物からの固体回収、38℃、pH9、250rpm、0 L/min(12hまでは1 L/min)
- 【図38】Seを含む廃棄物からの気体回収、38℃、pH9、250rpm、1 L/min 40
- 【図39】ジャーファーマンターを用いた培養系によるCIGS系の太陽光パネルの粉末試料を用いたレアメタル回収のまとめ
- 【図40】生成した元素態セレンの写真
- 【図41】CIGS太陽電池粉末からのレアメタル回収試算
- 【発明を実施するための形態】
- 【0011】
- 以下、本発明の実施の形態について説明する。
- 水溶性セレン化合物とは、セレンを含有する水溶性化合物を指す。水溶性セレン化合物の例としてはセレン酸、亜セレン酸などが挙げられる。
- 元素態セレンとは、他の元素と化合物を形成していない元素の形態のセレンを指す。 50

ここでいう「気体セレン」とは、気体として回収可能なセレン化合物を意味し、例えばジメチルジセレニド、ジメチルセレニドなどが挙げられる。

【0012】

本発明の処理方法においては、水溶性セレン化合物を還元して元素態セレン又は気体セレンを生成できる能力を有する微生物を使用する。上記微生物の種類は、水溶性セレン化合物を還元して元素態セレン又は気体セレンを生成できる能力を有する限り特に限定されず、細菌、酵母、原生動物、菌類、カビなどが挙げられる。水溶性セレン化合物を還元して元素態セレン又は気体セレンを生成できる能力を有する微生物としては、好気性微生物が好ましく、好気性細菌がより好ましい。本発明で用いる微生物としては更に好ましくは、*Pseudomonas*属細菌であり、特に好ましくは*Pseudomonas stutzeri*である。

10

【0013】

*Pseudomonas stutzeri*の一例としては、*Pseudomonas stutzeri* NT-I株 (NT-I株)を使用することができる。NT-I株は、金属リサイクル工場の排水溝底汚水から本発明者らが分離した微生物である。NT-I株の生理特性を以下に示す。NT-I株の16S rDNAの塩基配列は*Pseudomonas stutzeri* DSM 5190の16S rDNAの塩基配列と100%一致した。これらの結果から、NT-I株は*Pseudomonas stutzeri*に分類された。NT-I株は〒292-0818千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センターに、表示NT-I S I I D 6 9 3 7、受託番号N I T E P - 6 8 5の下、2008年12月4日に寄託されている(特許文献1を参照)。受託番号N I T E P - 6 8 5の寄託は、2012年1月30日に受託番号N I T E B P - 6 8 5としてブダペスト条約の下の国際寄託に移管されている。*Pseudomonas stutzeri* NT-I株(受託番号N I T E B P - 6 8 5)は、セレン酸還元活性、および亜セレン酸還元活性を有することが知られている。セレン酸還元活性は、セレン酸から生成される亜セレン酸を定量することによって測定することができる。亜セレン酸還元活性は、亜セレン酸から生成される元素態セレンを定量することによって測定することができる。

20

【0014】

試験項目	結果
形態	桿状
コロニーの色(TBS培地)	白色
グラム染色性	
運動性	+
O-Fテスト	O
カタラーゼ活性	+
オキシダーゼ活性	+

30

【0015】

NT-I株は好氣的条件下で増殖し、水溶性セレン化合物を還元することができる。この性質は、取り扱いの容易さ、反応速度の高さ、処理性能の安定性などの点で有利である。

【0016】

本発明においては、水溶性セレン化合物を含む試料を、水溶性セレン化合物を還元して元素態セレン又は気体セレンを生成できる能力を有する微生物と、温度が35を超えて40以下及びpH7.0~9.4の条件下で接触させることにより水溶性セレン化合物を還元して元素態セレン又は気体セレンを生成させることができる。

40

好ましくは、水溶性セレン化合物を含む試料を*Pseudomonas stutzeri* NT-I株(受託番号N I T E B P - 6 8 5)と温度35~40及びpH7.0~9.4の条件下で接触させることにより水溶性セレン化合物を還元して元素態セレン又は気体セレンを生成させる。

【0017】

温度は35を超えて40以下(*Pseudomonas stutzeri* NT-I株の場合には35~4

50



0 )であれば特に限定されないが、好ましくは36~40、より好ましくは37~39、最も好ましくは約38である。pHはpH7.0~9.4であれば特に限定されないが、好ましくはpH7.0~9.0、より好ましくは8.0~9.0、最も好ましくは約9.0である。

#### 【0018】

好ましくは、水溶性セレン化合物を含む試料を、水溶性セレン化合物を還元して元素態セレン又は気体セレンを生成できる能力を有する微生物と通気条件下において接触させることができる。通気条件は特に限定されないが、好ましくは1L/分~5L/分である。また、水溶性セレン化合物を含む試料を、水溶性セレン化合物を還元して元素態セレン又は気体セレンを生成できる能力を有する微生物と、上記の通り通気条件下において接触させた後に、通気を停止した条件下で接触させることができる。

10

#### 【0019】

また好ましくは、水溶性セレン化合物を含む試料を水溶性セレン化合物を還元して元素態セレン又は気体セレンを生成できる能力を有する微生物と攪拌条件下において接触させることができる。攪拌条件は特に限定されないが、250rpm以下の攪拌速度が好ましい。

#### 【0020】

本発明の方法を使用して、土壌や廃水から有害な水溶性セレン化合物を毒性の低い揮発性セレン化合物として除去することができる。また、本発明の方法によって得られたジメチルジセレニドをセレン精錬などに利用することによって、セレンの回収・再利用をすることができる。例えば、本発明の方法によって得られたジメチルジセレニドを従来のセレン精錬で使用されている燃焼炉に通せば、メチル基は二酸化炭素として除去され、生じた二酸化セレンをスクラパーで回収することができる。

20

#### 【0021】

水溶性セレン化合物を還元して元素態セレン又は気体セレンを生成できる能力を有する微生物をセレン酸の存在下で培養すると、亜セレン酸、元素態セレン、気体セレン(ジメチルジセレニド)の生成が経時的に観察される。1つの実施態様において、本発明の方法により1mMの水溶性セレン化合物を処理するために水溶性セレン化合物を還元して元素態セレン又は気体セレンを生成できる能力を有する微生物を培養する期間は、例えば1時間以上、好ましくは5時間以上、より好ましくは15時間以上、さらに好ましくは20時間以上であり、例えば20日以下、好ましくは15日以下、より好ましくは10日以下、さらに好ましくは5日以下である。

30

#### 【0022】

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は以下の実施例により特に限定されるものではない。

#### 【実施例】

#### 【0023】

実施例1：バイオリクターシステムにおけるSe還元・気化特性

実施例1では、バイオリクターシステムによるセレン酸および亜セレン酸の還元最適条件を検討した。

40

#### (1) 実験材料および方法

##### (1-1) 培養方法

5L容ジャーファーマンター(Bioneer-C500N型5L(S)、株式会社丸菱バイオエンジニアリング)にTSB培地3000mlを入れ、オートクレーブ処理を行った。500mmol/Lのセレン酸溶液もしくは亜セレン酸溶液を3ml本培地に添加した。12時間前培養を行った培養液を遠心分離により集菌し、OD<sub>660</sub>=1.0に調整後、30ml(1%)接種した。各培養条件で培養を行った。

#### 【0024】

##### (1-2) サンプルングと測定試料調製

ジャーファーマンターより培養液を適量採取し、菌体濁度(O.D.<sub>600</sub>)を測定した。培養液を2ml分取し、15,000rpm、5分間の条件で遠心分離を行った。遠心分離後、上清を

50

フィルタレーション(0.2 μm孔)した試料を上清試料とし、遠心分離により得られたペレットを沈澱試料とした。

【0025】

(1-3) セレン酸および亜セレン酸濃度の測定

上記の上清試料100 μlを分取し、超純水900 μlにて1/10倍希釈した。この希釈液をイオンクロマトグラフィー(ICS-1100; 検出器、DS6 HEATED CONDUCTIVITY CELL; カラム、IonPac AS12A; ガードカラム、AG12A; サプレッサー、ASRS300; 溶離液、3.0 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 流速、1.5 ml/min、ダイオネクス社)に供し、セレン酸および亜セレン酸の濃度を測定した。

【0026】

(1-4) 溶存セレン濃度の測定

上清試料1000 μlを、濃硝酸100 μlを添加した超純水8900 μlに添加し、1/10倍希釈した。この溶液を測定試料とし、ICP-AES(iCAP 6300 Duo、サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社)により全セレン濃度の測定を行った。

【0027】

(1-5) 元素態セレン濃度の測定

沈澱試料に超純水2 mlを加え、ボルテックスにより洗浄後、遠心分離により沈殿を回収した。繰り返し、洗浄作業を行った後、沈澱試料に1500 μlの濃硝酸と50 μlの濃硫酸を添加し、ボルテックスにより沈殿物を溶解させた。

溶解液を15,000rpm、5分間の条件で遠心分離を行い、上清と沈殿物を分離した。上澄みの溶液は10 mlメスフラスコに分取した。沈澱物は、再度同条件で溶解操作を行い、上清を回収し、上澄み溶液を回収したメスフラスコに分取した。10 mlメスフラスコに超純水を標線まで足し、定容したものを測定試料とした。測定試料はICP-AESによりセレン濃度の測定を行った。

【0028】

(1-6) 気体の回収

ジャーファーマンターの排気口にファーマードチューブを接続し、250 ml容の試薬瓶に添加した濃硝酸150 mlへバプリングを行った。濃硝酸との接触面にはエアーストーンを接続した。濃硝酸は経過時的にサンプリングし、ICP-AESによりセレン濃度を測定した。

【0029】

(1-7) 生菌数の計測と菌体濁度(O.D.<sub>600</sub>)の相関性

NT-1株の菌体あたりの還元速度を算出するため、経時的にNT-1株の菌体数とO.D.<sub>600</sub>を測定し、相関を求めた。

培養にはジャーファーマンターを用い、38 °C、pH9.0、1 L/min、250rpmの条件下において、2.1の培養方法で培養を行った。実験開始後、経時的に培養液を採取し、菌体数とO.D.<sub>600</sub>を測定した。菌体数は、カウンティングチャンバー内の60区画内の菌数を、位相差顕微鏡(DM1000、Laica)を用いてカウントし、平均値を求めた。O.D.<sub>600</sub>の測定には分光光度計(V-600、日本分光株式会社)を用いた。

【0030】

(2) 実験結果および考察

(2-1) ジャーファーマンターにおける還元特性

ジャーファーマンターによる培養におけるNT-1株のセレン酸および亜セレン酸の還元特性を典型的な経時変化の例として、38 °C、pH調整なし(初期pH7.0)、1 L/min、120rpmの培養条件下における培養の結果を図1に示す。0.5 mMのセレン酸を添加すると、約2時間の誘導機後にセレン酸還元が開始し、4時間以内にすべてのセレン酸が還元され、蓄積した亜セレン酸も22時間以内に培養液中から完全に消失した。三角フラスコにおける実験においては、セレン酸の還元は10時間以内、亜セレン酸の還元は16時間以内に行われている。このことから本培養条件においては、三角フラスコに比べセレン酸の還元が促進され、亜セレン酸の還元が遅くなっていると言える。

【0031】

10

20

30

40

50

亜セレン酸の還元に伴う元素態セレンの蓄積は、最大でも0.1 mmol/L以下であり、固体Seとしては20%以下の回収率になる。溶液中の溶存セレンもほとんど検出されていないことから、元素態セレンから気体Seへの移行が非常に速やかに行われていると考えられる。

#### 【0032】

##### (2-2) 生菌数の計測と菌体濁度(O.D.<sub>600</sub>)の相関性

ジャーファーマンターを用いた増殖系におけるNT-1株の菌体数の経時変化を図2に示す。この結果より、NT-1株の対数増殖期は約7時間であり、以降は定常期に達することがわかる。O.D.<sub>600</sub>の値もNT-1株の増殖に伴って増加することがわかった(図3)。

この時の比例係数を用いてO.D.<sub>600</sub>の値から菌体数を算出した。

#### 【0033】

##### (2-3) 比還元速度の算出

各培養条件の変化とセレン酸還元速度の関係を評価するために、各変数における単位時間当たりのセレン酸減少量をセレン酸還元速度(mmol/cell/hr)とし算出した。一例として、図4に38、pH調整なし(初期pH7.0)、1 L/min、120rpmの培養条件下におけるセレン酸濃度の経時変化を示す。セレン酸還元速度(mmol/cell/hr)は、まず直線的にセレン酸濃度が減少する期間において、その勾配(mmol/3 L/hr)を求めた。さらにセレン還元速度を算出した前後の菌体数(cell/ml)をO.D.<sub>600</sub>の値から算出し、勾配を菌体数で割ることでセレン酸還元速度(mmol/cell/hr)を算出した。亜セレン酸還元速度についても、同様に算出した。

#### 【0034】

##### (2-4) セレン酸、亜セレン酸還元に及ぼすpHの影響

これまでの知見から、NT-1株はpH6.0-9.0のpH域で増殖可能であり、増殖における最適pHは7.0であることが明らかになっている。そこでNT-1株のセレン酸、亜セレン酸還元に及ぼすpHの影響を調べた。

セレン酸還元については、pH6.5-9.0の範囲において4-5時間で0.5 mmol/Lのセレン酸を還元できることがわかった(図5)。また、pH10.0においては、生育が非常に遅いものの、60時間以降にセレン酸の還元が観察された(data not shown)。菌体あたりの比還元速度を算出した結果を図6に示した。この結果、ジャーファーマンター培養によるNT-1株のセレン酸還元は、pH7.5-8.0が最適であることがわかった。

#### 【0035】

亜セレン酸の還元については、0.5 mmol/Lの亜セレン酸を基質として添加し、培養を行った。この結果、pH7.0-9.0の範囲において、24時間以内に亜セレン酸を還元できることがわかった(図7)。特にpH9.0における還元は非常に速く15時間以内に亜セレン酸を還元することがわかった。菌体あたりの比還元速度を算出したところ、pH7.0-8.5まではほとんど活性が変わらず、pH9.0において2倍以上の比還元速度が得られた(図8)。これまでの三角フラスコにおける検討では、pH7.0が最適であったが、ジャーファーマンター培養においてはpHを9.0に維持することで、非常に速やかに亜セレン酸の還元が行われることがわかった。

#### 【0036】

##### (2-5) セレン酸、亜セレン酸還元に及ぼす温度の影響

これまでにNT-1株は10-42の温度域で増殖可能であり、38が増殖における最適温度であることが分かっている。そこでジャーファーマンター培養において、30-40に設定をして還元最適試験を行った。

この結果、30-40の範囲において、5時間以内にセレン酸が還元されることがわかった(図9)。特に38においてセレン酸が4時間で消失しており、最も早かった。比還元速度を算出したところ、35-38において高い比還元速度が得られた(図10)。これらの結果から、セレン酸還元における最適温度は38であると言える。

#### 【0037】

亜セレン酸の還元については、0.5 mmol/Lの亜セレン酸を基質として添加し、培養を行った。亜セレン酸の還元は、30-40の範囲において、18時間以内に亜セレン酸が還元さ

10

20

30

40

50

れることがわかった(図11)。亜セレン酸の還元は38 が最も早く15時間で還元が終わった。比還元速度を算出したところ、30-38 においてほぼ同等の高い値が得られた(図12)。これらの結果から、亜セレン酸の還元は38 が最適であることがわかった。

#### 【0038】

##### (2-6) セレン酸に及ぼす通気・攪拌の影響

NT-1株のセレン酸・亜セレン酸の還元における酸素移動速度に影響を及ぼす因子の検討は、三角フラスコなどを用いた培養であったためにこれまでに行われていない。本来嫌氣的反応である還元反応が好気条件において迅速に進むNT-1株の還元反応は非常に興味深い。そこでジャーファーマンター培養において、通気および攪拌について検討を行った。

セレン酸還元における通気量の変化の影響を図13に示した。この結果、0-5 L/minのどの通気量においても、4時間以内にセレン酸の還元が速やかに行われることがわかった。3時間時点でのセレン酸濃度は、通気量が大きいほど高くなっている。菌体数は通気量が大きいほど増殖が速く、0 L/minでは顕著に菌体の増殖が抑制された。比還元速度の比較においては、還元速度はほとんど変わらないものの、菌体数が抑制されていることから、0 L/minの比還元速度が高くなっている(図14)。これらのことから、NT-1株はセレン酸の還元について菌体数に依存しておらず、少量の菌体でも速やかに還元が進んでいることから、NT-1株は非常に高い還元能を持っていると考えられる。一方で、セレン酸還元が始まる点はどの時間においても2時間目以降であり、還元開始に他の因子が影響している可能性がある。

#### 【0039】

次に、セレン酸還元における攪拌の影響を図15に示した。この結果120-200rpmにおいては、5時間以内にセレン酸の還元は速やかに行われることがわかった。攪拌速度に対しての比還元速度の関係を図にすると、比還元速度が攪拌速度に反比例して高くなることがわかった(図16)。250rpmにおいても6時間以内にセレン酸はほとんど還元される。一方で、300rpmにおいてはセレン酸の還元が明らかに抑制され、9時間までに約半分のセレン酸が還元されるものの、それ以降セレン酸の還元は進まないことがわかった(data not shown)。菌体の増殖は、攪拌速度に比例して促進されていることから、セレン酸の還元は菌体数ではなく別の因子によって影響を受けていると考えられる(図15)。

#### 【0040】

##### (2-7) セレン酸還元と溶存酸素(DO)の相関

攪拌による培地中の酸素移動速度の影響を検討するために、溶存酸素(DO)とセレン酸還元の比較を行った(図17)。これらの図を比較すると、セレン酸還元はDOが0%になってから開始することがわかった。本来還元反応は嫌気条件下において進む反応であることから、菌体が増殖し、培養液中の酸素が消費されることで、微嫌氣的な状況ができ、その後セレン酸の還元が進んでいるものと考えられる。300rpmにおいては、セレン酸還元途中でDOが上昇し、同時にセレン酸還元が停止していることから、DOが0%まで低下するとセレン酸還元が進行し、DOが0%から増加すると還元が進まないことがわかる。

#### 【0041】

##### (2-8) 亜セレン酸に及ぼす通気・攪拌の影響

亜セレン酸還元における攪拌速度の変化の影響を図18に示した。この結果、120-400rpmの範囲において、15時間以内に亜セレン酸の還元が速やかに行われることがわかった。特に300rpmにおいて12時間で亜セレン酸が消失しており、最も早いことがわかった。菌体数の増殖に関しては、300rpmで菌体の生育が早く、400rpmでは菌体の生育速度は早いものの誘導期が長くなっていることがわかる。これらの結果から、亜セレン酸還元における最適攪拌速度は300rpmであると言える。

#### 【0042】

溶存酸素(DO)と亜セレン酸還元の比較を図19に示した。120-300rpmにおいては、DOが減少した後に亜セレン酸の還元が進行している。DOの減少は、図19における増殖曲線からも、菌体の増殖によるものと考えられる。このことから、亜セレン酸の還元はある程度菌体数が増加した状況下において進行しているものと考えられた。一方で、400rpmにおける

結果では、DOが0%まで下がらない状態においても亜セレン酸の還元が進行していることから、亜セレン酸還元では、DOが0%になることは必要条件ではないと言える。

【0043】

還元最適条件下において、NT-1株を12時間培養後、セレン酸を添加し、通気を1 L/minに保った場合と、0 L/minに変更し通気を止めた場合の結果を図20に示した。どちらの条件においても、セレン酸添加後から速やかに亜セレン酸が生成し、亜セレン酸の還元が進行することがわかった。亜セレン酸の還元速度を算出したところ、通気した場合には $9.6 \times 10^{-18}$  mol/cell/hr、通気を止めた場合には $3.8 \times 10^{-18}$  mol/cell/hrとなり、通気をすることで約2.5倍に促進されることがわかった(図20B)。これらの結果から、亜セレン酸の還元は、酸素を消費する反応である可能性が考えられる。

10

【0044】

(2-9) セレン酸、亜セレン酸還元の最適化まとめ

セレン酸および亜セレン酸の還元における最適条件を表1にまとめた。最適化前の条件下(38℃、pH調整なし、120rpm、1 L/min)においては、セレン酸還元は4時間以内に終わる一方で、亜セレン酸還元終了までには22時間かかっている(図1)。つまりセレン酸から元素態セレンまでの還元においては、亜セレン酸の還元が律速となっていることがわかる。このことから、セレン酸の還元が阻害されず、亜セレン酸の還元が最適となる条件を、セレンオキシアニオン還元最適条件とした。

【0045】

セレンオキシアニオン還元最適条件としては、セレン酸の最適還元条件と亜セレン酸の最適還元条件を採用し、培養中に培養条件を切り替える培養方法も考えられる。しかし、実際の廃棄物や排水においては不純物の混入といった、不確定因子による影響などによりセレン酸の還元時間が不明確となること、セレン酸の測定に30分近く時間を要するため、リアルタイムでモニタリングすることが難しいことなどの理由から、培養条件は初期設定条件から一定に保つことを選定基準とした。

20

【0046】

以上の結果をまとめた上で、セレンオキシアニオン還元最適条件における培養の結果を図21に示す。還元条件最適化前の培養に比べ(図1)、セレン酸から亜セレン酸還元終了までにかかる時間が、22時間から7時間にまで1/3に短縮された。元素態セレンの濃度も亜セレン酸還元に伴い上昇が観察された。生成した元素態セレンは、その後速やかに減少しており、気体セレンの生成が速やかに進んでいる可能性がある。元素態セレンからの気体セレンへの培養については、実施例2で検討した。

30

【0047】

【表1】

表1 各オキサニオン還元の最適条件

	温度(°C)	pH	攪拌(rpm)
セレン酸還元	38	7.5-8.0	150
亜セレン酸還元	38	9.0	300
セレンオキシアニオン還元最適条件	38	9.0	250

40

※通気量は1 L/min

【0048】

実施例2：ラボスケール・リアクターによるSe気化・回収プロセスの検討

気体セレンの生成を制御することは、固体セレンの回収率向上を図る上でも、重要なポイントである。そこで、実施例2では、微生物によるSe回収プロセス確立のために、気体セレンの回収方法を検討すると共に、気体セレン生成の制御方法を検討することで、固体セレン回収および気体セレン回収の検討を行った。また固体セレン回収条件を決定後、本プロジェクトの達成目標であるSe含有率30%以上の高濃度のSe汚泥回収を検討した。

【0049】

50

## (1) 実験材料および方法

### (1-1) 固体回収の培養方法

5 L容ジャーファーマンターにTSB培地3000 mlを入れ、オートクレーブ処理を行った。38℃、250rpm、1 L/minの条件で1時間通気を行った。12時間前培養を行ったNT-I前培養液を遠心分離により集菌し、再懸濁して $O.D._{660} = 1.0$ に調整後、30 ml (1%) 接種した。38℃、pH9.0、250rpm、1 L/minの培養条件で培養を行った。培養開始12時間後に、500mmol/Lのセレン酸溶液を3 ml本培養液に添加し培養を行った。

【0050】

### (1-2) 気体回収の培養方法

5 L容ジャーファーマンターにTSB培地3000 mlを入れ、オートクレーブ処理を行った。38℃、250rpm、1 L/minの条件で1時間通気を行った。500mmol/Lのセレン酸溶液を3 ml本培地に添加した。12時間前培養を行ったNT-I前培養液を遠心分離により集菌し、再懸濁して $O.D._{660} = 1.0$ に調整後、30 ml (1%) 接種した。38℃、pH9.0、250rpm、1 L/minの培養条件で培養を行った。

【0051】

### (1-3) 各相の分析方法

測定試料の調製および、各相の測定方法は実施例1に従った。

また、気相部の定性・定量としてGC-MSによる測定を行った。ジメチルセレン (DMSe)、ジメチルジセレン (DMDSe)、ジメチルスルフィド (DMS)、ジメチルジスルフィド (DMDS) については、評品を用いて保持時間により定性を行い、検量線を作成し定量を行った。ジメチルスルホセレンナイド (DMSSe) については、GC-MS-MSにより構造を推定し、保持時間を決定した。

【0052】

### (1-4) 硝酸への通気による気体Seトラップの検討

ジャーファーマンターの排気口にファーマードチューブを接続し、250 ml容の試薬瓶に添加した濃硝酸150 mlへバブリングを行った。濃硝酸との接触面にはエアーストーンを接続した。濃硝酸は経過時的にサンプリングし、ICP-AESによりセレン濃度を測定した。

また濃硝酸が入った試薬瓶の前には、水蒸気トラップ用に250 ml容の空の試薬瓶を接続した。

【0053】

### (1-5) 活性炭による気体Seトラップの検討

活性炭 (SKC社製 Anasorb CSC、coconut charcoal 226-16) による気体Se回収を検討するため、ジャーファーマンター排気管にファーマードチューブを使って活性炭を直列に2本接続した。接続した活性炭の後には、硝酸への通気を接続した。活性炭にはヤシガラ活性炭を用いた。また前部の活性炭の前には、水蒸気トラップ用に250 ml容の空の試薬瓶を接続した。

【0054】

活性炭は48時間で回収し、ジエチルエーテル20 mlを添加し、超音波装置により30分間抽出を行った。抽出液は、GC-MSにより定性・定量を行うと共に、ICP-AESにより全Se量を測定した。

【0055】

### (1-6) 固体Seの高濃度回収の検討

目標値であるSe含有率30%以上の高濃度のSe汚泥回収を行うため、セレン酸の終濃度が通常10倍の5 mmol/Lになるように添加し、固体回収条件において培養を行った。培養液は、全量遠心分離により沈殿を回収した。得られた沈殿は、洗浄のため70%エタノールにて懸濁し遠心分離をして沈殿を回収した。洗浄操作を再度行った後、沈殿を100%エタノールに懸濁し、ドラフトチャンパー内で乾燥したものをSe汚泥とした。Se汚泥は元素態セレンの溶解と同じ方法で溶解し、ICP-AESによりSe濃度を測定した。

【0056】

## (2) 実験結果および考察

10

20

30

40

50

### (2-1) 元素態セレン減少量への通気の影響

還元最適条件下において、NT-1株を12時間培養後、セレン酸を添加し、通気を1 L/minに保った場合と、0 L/minに変更し通気を止めた場合の結果を図2-2に示した。どちらの条件においても、セレン酸添加後から速やかに元素態セレンが生成することがわかった。元素態セレンの生成は通気をした場合のほうが早く、元素態セレンの最大濃度は0.37 mmol/Lであった。通気を止めた場合には元素態セレンの生成がやや遅れるものの、元素態セレンの最大濃度は0.44 mmol/Lと通気をした場合よりも高くなった(図2-2A)。

#### 【0057】

この結果から、元素態セレンの減少は明らかに通気の影響を受けており、通気をすることで、元素態セレンの減少が促進されることがわかった。元素態セレン減少速度を算出したところ、通気した場合には元素態セレンの減少速度が $2.6 \times 10^{-18}$  mol/cell/hr、通気を止めた場合には $0.5 \times 10^{-18}$  mol/cell/hrとなり、通気をすることで約5.3倍に促進されることがわかった(図2-2B)。

10

#### 【0058】

これらの結果から、還元最適条件を気体セレン回収条件とした。また、固体セレン回収条件は、38℃、pH9.0、250rpm、0 L/minとした。通気を停止した場合、菌体生育への影響が大きいことから、還元最適条件において菌体を12時間培養後、基質を添加することで固体セレン回収を行うこととした。

#### 【0059】

### (2-2) 気体セレンの定性

20

元素態セレンの減少に伴い発生すると考えられる気体セレンの定性を行うため、GC-MSを用いて気相の測定を行った。典型的な測定結果を図2-3に示した。この結果、ジャーファーメンター培養においては、DMDSeがメインピークとして検出された。またDMSSeに当たる保持時間にピークが検出された。スルフィドとしては、DMDSが検出されている。

DMSSeについては、DMDSeとDMDSの存在下において、平衡反応により生成することが考えられた。そこで、室温において $99.4 \times 10^3$  mg/LのDMDSe 350  $\mu$ l、 $53 \times 10^3$  mg/LのDMDS 350  $\mu$ lを混合し、常温において保存バイアル瓶を用いて密閉下で12時間静置した後、GC-MSにより液相を測定した。この結果、保持時間12.7 min付近にDMSSeのピークが確認された(図2-4)。このことから、今回培養中の気相部から検出されたDMSSeについても、微生物反応により生成したDMDSeとDMDSが平衡反応を起こすことで生成した可能性も考えられる。

30

#### 【0060】

### (2-3) 硝酸トラップによる気体回収とマスバランス

元素態セレンの減少に伴い生成する気体セレンの経時的な定量を行うため、ジャーファーメンター培養の排気を、硝酸に通すことで気体セレンをトラップし気体回収を試みた。還元最適条件下において、セレン酸を添加し培養を行った結果を図2-5に示した。

#### 【0061】

この結果、セレン酸・亜セレン酸の還元が進行し元素態セレンが生成した後に、元素態セレンの減少が始まり、気体セレンが生成していることがわかった。培養120時間後の各相の収量を算出したところ、気体セレンが0.356 mmol/Lで71.2%の回収率であった(表2)。硝酸トラップによるDMDSeの回収効率は81.3%という値が得られている。この値を用いて補正すると、87.6%が気体セレンとして生成していると考えられた。微生物の生成する気体セレンを定量的に回収した前例はなく、今回70%以上の高回収率で気体セレンを回収し経時的に測定できたことは世界でも初めての結果である。

40

#### 【0062】

これまでにセレン酸を-2価の気体状セレンまで還元することが知られている微生物の気化速度は遅く、Bacillus sp. STG-83株は1 mmol/Lのセレン酸をLB培地に添加した場合、4日間で約0.03%、Enterobacter cloacae SLD1a-1株は1 mmol/Lの亜セレン酸をTSB培地に添加した場合10日間で約0.5%を気化すると報告されている。これらの微生物と比べて、NT-1株によるジャーファーメンター培養では、非常に速い速度で気体セレンが生成してい

50

ると言える。

【0063】

また、セレン酸および亜セレン酸が還元された後にも、溶存セレン濃度が減少しないことから、DMDSeなどが一度液相に溶出している可能性が考えられる。

培養120時間後の各相の収量を合計すると85.8%となり(表2)、これに硝酸による気体セレンの回収率を考慮した場合、102.2%となることから、NT-1株によるセレン酸還元における気相、液相、固相のマスバランスがとれていると言える。

【0064】

【表2】

表2 還元最適条件における各相の収量 (38°C、pH9.0、1L/min、250rpm、120h)

項目名	溶液	固体	気体	合計	気体(補正)	補正後
mmol/L	0.053	0.020	0.356	0.429	0.438	0.511
%	10.5	4.0	71.2	85.8	87.6	102.2

\*硝酸によるメチル化セレンのトラップ効率(81.3%)から算出

【0065】

(2-4) 活性炭での気体セレン回収の検討

気体セレンの回収方法として、運搬が簡便であり、危険性の伴わない活性炭を用いた気体セレンの回収を試みた。還元最適条件下において、セレン酸を添加し、NT-1株によるジャーファーマンター培養を行った。ジャーファーマンターの排気管に活性炭を直列に2本接続し、ジャーファーマンターに近いものを活性炭(1)、次を活性炭(2)とした。活性炭の後ろには硝酸を介して通気を行った。各活性炭および硝酸の元素測定結果を図26に示した。

【0066】

この結果、添加したセレン酸の量から、元素態セレンおよび溶存セレンの量を引いた予想気体量に対して、前部に接続した活性炭(1)で79.9%、後部に接続した活性炭(2)で7.6%の気体セレンが吸着していることがわかった。このうち活性炭(1)においては59.5%が、活性炭(2)においては14.6%がDMDSeであることをGC-MSにより確認した。DMSSeのピークも検出されたことから、残りはDMSSeであると考えられた。これらの活性炭の後に接続した硝酸トラップからはセレンは検出されておらず、ほぼすべての気体セレンが活性炭に吸着されたものと考えられる。2本の活性炭による吸着量は合計で87.5%となる。約10%の誤差は、活性炭からのジエチルエーテルによる抽出効率や、抽出操作中のメチル化Seの揮発などの影響が考えられる。活性炭を用いて微生物由来のメチル化セレンを回収した前例はなく、本結果は高効率で活性炭によりメチル化セレンを濃縮回収した初めての知見である。

また活性炭による吸着において、水蒸気による脱離も考えられることから、活性炭による吸着操作の前段階において水蒸気を効率的にトラップすることで、活性炭による気体セレンの吸着効率が向上する可能性も考えられる。

【0067】

(2-5) 通気制御による高濃度固体セレン回収

上記(2-1)において、通気を制御することで元素態セレンが蓄積するという結果が得られたことから、固体セレンの回収を試みた。セレン酸の終濃度が通常の10倍の5 mmol/Lになるように添加し、固体回収条件において培養を行った結果を図27に示した。培養中、亜セレン酸濃度の減少が停止したため、途中で1 L/minの通気を行った。通気は還元速度の減少が観察された時間に行い、33時間目に1 L/min、250rpmの条件で10分間、50時間目に1 L/min、120rpmの条件で1時間、122時間目に1 L/min、250rpmの条件で8時間の通気を行った。

【0068】

10

20

30

40

50



培養後、168時間ですべての亜セレン酸が還元され、4.39 mmol/Lの元素態セレンが生成した。このときの回収率は87.9%であり、0.5 mmol/Lのセレン酸を添加し同条件で培養を行った場合の87.8%とほぼ同等の回収率が得られた。

【0069】

亜セレン酸の還元が終了した培養168時間目に培養液を全量回収し、エタノールにて洗浄後、乾燥させた。この乾燥した回収物をSe汚泥とし、セレン含有量を測定した。この結果、乾燥重量当たり47.1% (w/w) のセレンを含有していることがわかった(表3)。本プロジェクトにおける目標値は30%であり、目標値は達成することができた。

【0070】

【表3】

10

表3 Se汚泥のセレン含有率 (% (w/w))

ave	±	std
47.1	±	9.2

【0071】

実施例3：実排水からのSe回収の検討

20

(1) 材料と実験方法

(1-1) 排水の分析

2種類のSe含有排水を、溶液試料1、溶液試料2とした。実験には溶液試料A2を使用した。測定は、溶液試料1、溶液試料2を1/10、1/100希釈測定溶液を調製し、液性を整えたのち、ICP-AESにより測定を行った。測定回数はn=3で行った。

【0072】

(1-2) 固体回収の培養方法

5L容ジャーフェーマンターにTSB培地2700 mlを入れ、オートクレーブ処理を行った。38℃、250rpm、1 L/minの条件で1時間通気を行った。12時間前培養を行ったNT-1株の前培養液を遠心分離により集菌し、再懸濁してOD<sub>660</sub> = 1.0に調整後、ジャーフェーマンターに30 ml (1%) 接種した。38℃、pH9.0、250rpm、1 L/minの培養条件で培養を行った。培養開始12時間後に、溶液試料2 (300 ml) を滅菌せずに本培養液に添加した。

30

【0073】

(1-3) 気体回収の培養方法

5L容ジャーフェーマンターにTSB培地2700 mlを入れ、オートクレーブ処理を行った。38℃、250rpm、1 L/minの条件で1時間通気を行った。溶液試料2 (300 ml) を滅菌せずに本培地に添加した。12時間前培養を行ったNT-1株の前培養液を遠心分離により集菌し、再懸濁してOD<sub>660</sub> = 1.0に調整後、ジャーフェーマンターに30 ml (1%) 接種した。38℃、pH9.0、250rpm、1 L/minの培養条件で120時間培養を行った。

40

【0074】

(1-4) 各相の分析方法

測定試料の調製および、各相の測定方法は上記に従った。

【0075】

(2) 結果と考察

(2-1) 溶液試料の分析

溶液試料のSe含有量を表4に示した。溶液2について、イオンクロマトグラフィーによる定量を行ったところ、セレン酸が4.54 mmol/L、亜セレン酸が0.791 mmol/Lであった。この値は、ICP-AESによる測定結果5.53 mmol/Lとほぼ一致する。

Se含有排水としては、セレン酸の含有量が高いため、物理化学的方法では処理が難しい排水である。溶液試料1と溶液試料2は、同じ場所から採取したが、濃度は約5~10 mmol

50

/Lと約2倍の差が得られた。他の元素としてSiをはじめとしてほとんどの元素が、溶液試料1の濃度が溶液試料2よりも高いという結果が得られた。

【0076】

NT-1株は50 mmol/Lの高濃度においても、セレン酸・亜セレン酸の還元能を維持することから、本排水に適用することは可能であると考えられた。他の元素としても、生育の障害になるような元素は検出されておらず、微生物処理に適した排水であると言える。

【0077】

【表4】

表4 溶液試料の組成

試料名	溶液試料①				溶液試料②			
	ave	±	std	CV	ave	±	std	CV
元素	[mmol/L]			[%]	[mmol/L]			[%]
Se	10.6	±	0.2	(2.1)	5.53	±	0.15	(2.7)

10

【0078】

(2-2) 実排水からのSe固体回収の検討

固体回収条件における培養の結果を図2-8および表5に示した。固体回収条件において、排水から78.8%が固体Seとして回収された。モデル系においては、固体回収条件において87.7%の回収率が得られている。今回、モデル系と比較し回収率が若干低下したものの、高い回収率が得られた。セレン酸・亜セレン酸の還元についても非常に速やかであり、モデル系と遜色がなかった。これらの結果から、本排水からの固体Se回収が可能であると言える。

20

【0079】

回収点において、液体Seとして8.6%、予想される気体Seとして12.5%が存在している。このことから、固体Seからさらに反応が進行してメチル化による揮発化が進行している可能性が考えられる。今後、より高い固体Se回収率を得るためには、通気の制御などによるハンドリングの検討が必要であると考えられる。

【0080】

30

【表5】

表5 固体回収時の各相の収量

項目名	液体	固体	気体(予想)	合計
mmol/L	0.056	0.507	0.081	0.644
%	8.6	78.8	12.5	100

(38°C, pH9.0, 1 L/min, 250rpm, 24h)

【0081】

40

(2-3) 実排水からのSe気体回収の検討

気体回収条件における培養の結果を図2-9および表6に示した。気体回収条件において、排水から38.9% (実測値) が気体Seとして回収された。モデル系においては、気体回収条件において71.2% (実測値) の回収率が得られている。今回、モデル系と比較すると約半分の回収率であった。

セレン酸・亜セレン酸の還元についても非常に速やかであり、オキサニオンの還元においてはモデル系と遜色がなかった。回収時における固体の含有量は3.8%であり、モデル系における4.0%と同じ水準まで減少している。一方で、液体Seの含有量が非常に高く、モデル系の10.5%に比べ、排水では35.9%となっている。

【0082】

50

これらのことから、気体Seの回収率低下は、固体Seからのメチル化による揮発化において、液中にSeが残存していることに起因していると考えられる。モデル系と比べ、排水中には、KやCaといった元素が含まれている。これらの元素が影響している可能性が考えられる。

【0083】

【表6】

表6 気体回収時の各相の収量

項目名	液体	固体	気体	合計
mmol/L	0.221	0.023	0.240	0.484
%	35.9	3.8	38.9	78.6

10

(38°C, pH9.0, 1 L/min, 250rpm, 120h)

【0084】

【表7】

表7 補正計算後の各相の収量

項目名	液体	固体	気体(補正)	合計
mmol/L	0.221	0.023	0.295	0.539
%	35.9	3.8	58.9	87.6

20

(38°C, pH9.0, 1 L/min, 250rpm, 120h)

\*硝酸によるメチル化セレンのトラップ効率(81.3%)から算出

【0085】

実施例4：太陽光パネルからのSe回収の検討

実施例4では、最適化したジャーファーマンターを用いた培養系による、CIGS系(銅(Cu)とインジウム(In)、ガリウム(Ga)、セレン(Se)の化合物を材料とする薄膜状態の物質)の太陽光パネルの粉末試料を用いたセレン回収実験を行った。

【0086】

(1) 材料と実験方法

30

(1-1) 粉末試料の分析方法

マイクロウェーブ試料分解装置により、分解溶液を用いて試料溶液化を行った。分解溶液は濃硝酸4 ml、濃フッ化水素酸4 mlを用いた。また、レアアースの溶解を行うために、分解操作後、ホウ酸1 gを添加し、再度分解操作を行った。測定は、各試料の液性を整えたのち、原液測定試料、1/1000、1/100000希釈測定溶液を調製し、誘導結合プラズマ質量分析装置(ICP-MS)(X-Series 2、サーモフィッシャーサイエンティフィック(株))により測定を行った。測定回数はn=3で行った。

【0087】

(1-2) 溶液試料1の調製と分析方法

40

粉末試料を1 g、電子天秤により秤量し、50 mlコーニングチューブに分取した。これに濃硝酸を5 ml分注し、試料を溶解した。更に10 mlピペッターにより95 mlの超純水を加え、全量100 mlとした。これを5分間、遠心分離(15,000rpm)にかけ、得られた上澄み溶液をディスクフィルター(0.2 μm孔)によりフィルトレーションした。ここで得られた溶液を溶液試料1とし、誘導結合プラズマ発光分光分析装置(ICP-AES)(iCAP 6300 Duo、サーモフィッシャーサイエンティフィック(株))で測定をした。ICP-AESでの測定は、各試料を1/10、1/100、1/1000希釈測定溶液を調製し、液性を整えたのち、ICP-AESにより測定を行った。測定回数はn=3で行った。

【0088】

(1-3) 溶液試料2および中和試料の作製

50

粉末試料を1 g、電子天秤により秤量し、50 mlコーニングチューブに分取した。これに

濃塩酸を4 ml、濃硝酸を1 ml分注し、超音波で30分間試料を溶解した。更に10 mlピペッターにより95 mlの超純水を加え、全量100 mlとした。これを5分間、遠心分離（15,000rpm）にかけ、得られた上澄み溶液をディスクフィルター（0.2 μm孔）によりフィルトレーションした。ここで得られた溶液を溶液試料2とし、遠心分離にて得られた沈澱物を酸溶解残渣として、ICP-AESで測定をした。溶液試料2に5N 水酸化ナトリウム溶液を10 ml加え、遠心分離を行い、上清と沈澱に分けた。ここで得られた上清を中和溶液試料、沈澱を中和沈澱物として、ICP-AESで測定をした。ICP-AESでの測定は、各試料を1/10、1/100希釈測定溶液を調製し、液性を整えたのち、ICP-AESにより測定を行った。測定回数はn=3で行った。

10

## 【0089】

## (1-4) 固体回収の培養方法

5 L容ジャーファーマンターにTSB培地3000 mlを入れ、オートクレーブ処理を行った。38℃、250rpm、1 L/minの条件で1時間通気を行った。12時間前培養を行ったNT-I前培養液を遠心分離により集菌し、再懸濁後 $OD_{660} = 1.0$ に調整後、30 ml（1%）接種した。38℃、pH9.0、250rpm、1 L/minの培養条件で培養を行った。培養開始12時間後に、溶液試料1 30 mlもしくは中和溶液試料40 mlを本培養液に添加し培養を行った。

## 【0090】

## (1-5) 気体回収の培養方法

5 L容ジャーファーマンターにTSB培地3000 mlを入れ、オートクレーブ処理を行った。38℃、250rpm、1 L/minの条件で1時間通気を行った。溶液試料1（30 ml）もしくは溶液試料2（35 ml）または中和溶液試料40 mlを滅菌せずに本培地に添加した。12時間前培養を行ったNT-I前培養液を遠心分離により集菌し、再懸濁後 $OD_{660} = 1.0$ に調整後、30 ml（1%）接種した。38℃、pH9.0、250rpm、1 L/minの培養条件で培養を行った。

20

## 【0091】

## (1-6) 各相の分析方法

測定試料の調製および、各相の測定方法は上記に従った。また硝酸イオン、亜硝酸イオンの定量はイオンクロマトグラフィー（ICS-1100、日本ダイオネクス（株））を用い、測定方法は上記に従った。

## 【0092】

## (1-7) 付着物の回収と測定

気体回収条件において容器壁面についた付着物を回収し、元素分析を行った。分取したサンプルは沈澱試料の測定と同様の方法で溶解し、ICP-AESによる分析を行った。

30

## 【0093】

## (2) 結果と考察

## (2-1) 粉末試料および溶液試料の分析結果

粉末試料のSe組成、溶液試料のSe組成を、表8に示した。溶液試料について、イオンクロマトグラフィーによる定量を行ったところ、セレン酸は検出されず、亜セレン酸が45.5 mmol/Lであった。この値は、ICP-AESで定量した値44.9 mmol/Lとほぼ一致した（表8）

## 【0094】

40

【表 8】

表 8 粉末試料の多元素分析結果

元素	ave	±	std	CV
	[mmol・kg <sup>-1</sup> ]			[%]
Se	4520	±	139	(4)
In	1570	±	40	(3)
Cu	2030	±	80	(4)
Ga	570	±	23	(4)
Zn	29	±	1	(4)
Fe	2	±	0	(11)
Cr	2	±	0	(8)

10

溶液試料1の多元素分析結果

元素	ave	±	std	CV
	[mmol・L <sup>-1</sup> ]			[%]
Se	44.9	±	0.2	(1)
In	25.4	±	0.1	(1)
Cu	28.6	±	0.2	(1)
Ga	7.1	±	0.1	(1)

20

【0095】

微生物と反応させるため、粉末試料を酸溶解した組成結果を表9に、溶液試料2を中和した組成結果を表9に示した。中和処理と遠心分離することにより、Se、Gaは上清に、In、Cuは沈殿に分別することができた。

【0096】

【表 9】

表 9 溶液試料 2 の多元素分析結果

元素	ave	±	std	CV
	[mmol・L <sup>-1</sup> ]			[%]
Se	43.5	±	0.3	(0)
In	26.7	±	0.0	(0)
Cu	29.8	±	1.6	(0)
Ga	7.6	±	0.0	(0)

30

中和溶液の多元素分析結果

元素	ave	±	std	CV
	[mmol・L <sup>-1</sup> ]			[%]
Se	38.4	±	1.2	(0)
In	0.0	±	0.0	(0)
Cu	0.4	±	0.1	(0)
Ga	5.8	±	0.0	(0)

40

【0097】

(2-2) 溶液試料1からのSe固体回収の検討

溶液試料1からの固体回収条件における培養の結果を図30および表10に示した。固体回収条件において、溶液試料1から27.5%が固体Seとして回収された。モデル系においては、固体回収条件において87.7%の回収率が得られていることから、回収率が低下していることがわかる。特に亜セレン酸の還元が明らかに阻害されている。この原因として粉末試料の溶解に使用した硝酸の影響や、共存するCIGS系の他の金属元素による影響が考え

50

られた。硝酸・亜硝酸の挙動を図3-1に示す。硝酸が還元され精製した亜硝酸が還元され、それと並行するように亜セレン酸の還元が徐々に進んでいることがわかる。このことから硝酸の存在が、亜セレン酸の還元に何らかの影響を及ぼしていると考えられる。

【0098】

【表10】

表10 固体回収時の各相の収量

項目名	溶液	固体	気体(予想)	合計
mmol/L	0.402	0.140	0	0.542
%	78.9	27.5	0	106.4

(38°C, pH9.0, 1 L/min, 250rpm, 200h)

10

【0099】

(2-3) 中和溶液試料からのSe固体回収の検討

硝酸の影響を抑えるために、硝酸の濃度を減らして粉末試料を溶解した。また、他の金属元素の影響を除くために、中和を行った中和溶液試料を用いて培養を行った。中和試料からの固体回収条件における培養の結果を図3-2および表1-1に示した。固体回収条件において、中和溶液試料から60.0%が固体Seとして回収された。中和溶液試料においては、亜セレン酸の還元は非常に速やかであり、溶液試料1に比べ回収率が約2.2倍に向上した。

20

【0100】

培養中、溶液試料1においては、培養液が黒茶色に変色する現象が観察された。中和溶液試料を用いた場合には、この現象は確認されなかったことから、中和によりCuやInが除去されたことで回収率が向上した可能性も考えられる。

【0101】

今回、中和試料からの回収において、元素態セレンの最大濃度0.39 mmol/Lは、添加濃度の60.0%であり、その後元素態セレンは減少し120時間では23.8%にまで減少した。モデル系においては、元素態セレンの回収率は最大で87.8%で133時間では75.7%まで減少していることから、モデル系に比べ減少量が大きく気体セレンの生成が進んでいると考えられる。気体セレンの生成には通気が大きく影響することから、基質添加前の12時間の培養における通気の制御などを工夫することで元素態セレンの減少を防ぎ、回収率を向上できる可能性がある。

30

【0102】

【表11】

表11 中和試料からの固体回収時の各相の収量

項目名	溶液	固体	気体(予想)	合計
mmol/L	0.082	0.389	0.177	0.649
%	12.7	60.0	27.3	100.0

(38°C, pH9.0, 1 L/min, 250rpm, 27h)

40

【0103】

実施例4におけるジャーファーマンターを用いた培養系による、CIGS系(銅(Cu)とインジウム(In)、ガリウム(Ga)、セレン(Se)の化合物を材料とする薄膜状態の物質)の太陽光パネルの粉末試料を用いたレアメタル回収のまとめを図3-9に示す。

【0104】

(2-4) 溶液試料からのSe気体回収の検討

溶液試料1からの気体回収条件における培養の結果を図3-3および表1-2に示した。気体回収条件において、溶液試料1から11.9%(実測値)が気体Seとして回収された。モデル系においては、気体回収条件において71.2%(実測値)の回収率が得られていることがか

50

ら、回収率が非常に低下している。

しかし、ここでは、固体回収条件において見られた、亜セレン酸の還元への阻害は観察されなかった。図34に示した硝酸・亜硝酸の挙動においては、硝酸は速やかに還元されるものの、亜硝酸は還元されないことがわかった。

【0105】

亜セレン酸還元が速やかに進んでいる一方で、気体Seの回収率は非常に低い。元素態セレンの測定においては、その値が不安定であったことから、生成した固体Seが均一に分散されず凝集が起こっている可能性が考えられた。固体Seが凝集することにより、気体セレンの生成が抑制された可能性も考えられる。

【0106】

【表12】

10

表12 溶液試料1からの気体回収時の各相の収量

項目名	液体	固体	気体	合計
mmol/L	0.245	0.046	0.056	0.347
%	52.2	9.7	11.9	73.8

(38°C, pH9.0, 1 L/min, 250rpm, 290h)

補正計算後の各相の収量

20

項目名	液体	固体	気体(補正)	合計
mmol/L	0.245	0.046	0.069	0.360
%	52.2	9.7	13.7	75.6

(38°C, pH9.0, 1 L/min, 250rpm, 290h)

\*硝酸によるメチル化セレンのトラップ効率(81.3%)から算出

【0107】

(2-5) 溶液試料2からのSe気体回収の検討

溶液試料2からの気体回収条件における培養の結果を図35および表13に示した。気体回収条件において、溶液試料2から14.4% (実測値) が気体Seとして回収された。モデル系においては、気体回収条件において71.2% (実測値) の回収率が得られていることから、溶液試料1に比べ若干改善したものの回収率は依然として低い。

30

この結果から、Se気体回収においては、硝酸濃度よりも、共存するCuやInといった金属元素の存在が悪影響していることが示唆された。

【0108】

## 【表 1 3】

表 1 3 溶液試料 2 からの気体回収時の各相の収量

項目名	液体	固体	気体	合計
mmol/L	0.314	0.070	0.080	0.464
%	56.8	12.7	14.4	83.9

(38°C, pH9.0, 1 L/min, 250rpm, 144h)

## 補正計算後の各相の収量

項目名	液体	固体	気体(補正)	合計
mmol/L	0.314	0.070	0.098	0.482
%	56.8	12.7	17.7	87.2

(38°C, pH9.0, 1 L/min, 250rpm, 144h)

\* 硝酸によるメチル化セレンのトラップ効率(81.3%)から算出

10

## 【0109】

(2-6) 中和溶液試料からのSe気体回収の検討

中和溶液試料からの気体回収条件における培養の結果を図3-6および表1-4に示した。気体回収条件において、中和溶液試料から44.3% (実測値) が気体Seとして回収された。中和溶液試料を用いた回収においては、溶液試料1に比べ回収率が約3.7倍に向上した。

20

この原因としては、中和によりCuやInが除去されたことで、溶液試料1からの気体セレン回収実験において観察されたような凝集が解消され、気体セレンが生成しやすくなったためであると考えられる。元素態セレンの測定においても、CuやInが原因と思われる凝集による不均一が原因と考えられる元素態セレンの測定値のばらつきは観察されなかった。

モデル系の気体Se回収率(71.1%)に比べ、回収率が低いものの、より厳密に阻害金属元素を除去することで、回収率はさらに向上するものと考えられる。

## 【0110】

## 【表 1 4】

表 1 4 中和試料からの気体回収時の各相の収量

30

項目名	液体	固体	気体	合計
mmol/L	0.185	0.028	0.287	0.501
%	28.6	4.4	44.3	77.2

(38°C, pH9.0, 1 L/min, 250rpm, 120h)

## 補正計算後の各相の収量

項目名	液体	固体	気体(補正)	合計
mmol/L	0.185	0.028	0.353	0.566
%	28.6	4.4	54.4	87.4

(38°C, pH9.0, 1 L/min, 250rpm, 120h)

\* 硝酸によるメチル化セレンのトラップ効率(81.3%)から算出

40

## 【0111】

実施例 5 :

実施例 5 では、ジャーファーマンターを用いた培養系による、Seを含む太陽光パネル廃棄物を用いたSe回収実験を行った。

## 【0112】

(1) 材料と実験方法

50



## ( 1 - 1 ) 粉末試料の作製と分析方法

Seを含む廃棄物粉末試料0.25 gを分取し、分解溶液として濃硝酸10 mlを用いた。マイクロウェーブ試料分解装置により、分解溶液を用いて試料溶液化を行った。測定は、各試料の液性を整えたのち、原液測定試料、1/1000、1/100000希釈測定溶液を調製し、誘導結合プラズマ質量分析装置 ( ICP-MS ) ( iCAP 6300 Duo、サーモフィッシャーサイエンティフィック ( 株 ) ) により測定を行った。測定回数はn=3で行った。

## 【 0 1 1 3 】

## ( 1 - 2 ) 溶液試料の調製と分析方法

粉末試料を2 g、電子天秤により秤量し50 mlコーニングチューブに分取した。これに濃硝酸1 mlずつ1000 ul可変式マイクロピペッターを用いて10 ml分注し、試料を溶解した。更に10 mlピペッターにより20 mlの超純水を加え、全量30 mlとした。これを5分間、遠心分離 ( 15,000rpm ) にかけて、得られた上澄み溶液をディスクフィルター ( 0.2 μm孔 ) によりフィルトレーションした。ここで得られた溶液を酸溶解試料とし、遠心分離にて得られた沈殿物を酸溶解残渣として、誘導結合プラズマ発光分光分析装置 ( ICP-AES ) ( iCAP 6300 Duo、サーモフィッシャーサイエンティフィック ( 株 ) ) で測定をした。得られた酸溶解試料に5N水酸化ナトリウム溶液を30 ml加えた。生成された沈殿物除去のため、5分間遠心分離 ( 15,000rpm ) にかけて、上澄み溶液と沈殿物を分離した。ここで得られた沈殿物を中和沈殿物とした。ここで得られた上澄み溶液はディスクフィルター ( 0.2 μm孔 ) を用いてフィルトレーションを行った。

## 【 0 1 1 4 】

上記までの操作を3回繰返し、各溶液を混合し、全量150 mlの溶液試料を調製した。溶液試料の測定は、各試料を1/10、1/100、1/1000希釈測定溶液を調製し、液性を整えたのち、ICP-AESにより測定を行った。測定回数はn=3で行った。

## 【 0 1 1 5 】

## ( 1 - 3 ) 固体回収の培養方法

5 L容ジャーファーマンターにTSB培地3000 mlを入れ、オートクレーブ処理を行った。38 °C、250rpm、1 L/minの条件で1時間通気を行った。12時間前培養を行ったNT-I前培養液を遠心分離により集菌し、再懸濁後OD<sub>660</sub> = 1.0に調整後、30 ml ( 1% ) 接種した。38 °C、pH9.0、250rpm、1 L/minの培養条件で培養を行った。培養開始12時間後に、溶液試料50 mlを本培養液に添加し培養を行った。

## 【 0 1 1 6 】

## ( 1 - 4 ) 気体回収の培養方法

5 L容ジャーファーマンターにTSB培地3000 mlを入れ、オートクレーブ処理を行った。38 °C、250rpm、1 L/minの条件で1時間通気を行った。溶液試料50 mlを滅菌せずに本培地に添加した。12時間前培養を行ったNT-I前培養液を遠心分離により集菌し、再懸濁後OD<sub>660</sub> = 1.0に調整後、30 ml ( 1% ) 接種した。38 °C、pH9.0、250rpm、1 L/minの培養条件で培養を行った。

## 【 0 1 1 7 】

## ( 1 - 5 ) 各相の分析方法

測定試料の調製および、各相の測定方法は上記に従った。

## 【 0 1 1 8 】

## ( 2 ) 結果と考察

## ( 2 - 1 ) 粉末試料の分析結果および溶液試料の調製と調整過程における各元素濃度の変化

粉末試料の測定を行った結果、セレンを含む廃棄物の主成分であるSeが検出された。Se濃度は、908 mmol/kgであった。

溶液試料のSe濃度は30.6 mmol/Lであり、イオンクロマトグラフィーによる定量を行ったところ、セレン酸は検出されず、亜セレン酸が28.6 mmol/Lであることがわかった。

## 【 0 1 1 9 】

## ( 2 - 2 ) 溶液試料からのSe固体回収の検討

固体回収条件における培養の結果を図37および表15に示した。固体回収条件において、廃棄物の溶解溶液から83.6%が固体Seとして回収された。モデル系においては、固体回収条件において87.7%の回収率が得られていることから、モデル系と同程度の高い回収率が得られた。セレン酸・亜セレン酸の還元についても非常に速やかであり、本Seを含む廃棄物からの固体Se回収が可能であると言える。

【0120】

【表15】

表15 固体回収時の各相の収量

項目名	溶液	固体	気体(予想)	合計
mmol/L	0.046	0.483	0.049	0.578
%	7.9	83.6	8.4	100.0

(38°C, pH9.0, 1 L/min, 250rpm, 12h)

10

【0121】

(2-3) 溶液試料からのSe気体回収の検討

気体回収条件における培養の結果を図38および表16に示した。21.1% (実測値) が気体セレンとして回収された。モデル系においては、気体回収条件において71.2% (実測値) の回収率が得られており、モデル系と比較すると約3分の1の回収率であった。

セレン酸・亜セレン酸の還元については非常に速やかであり、オキサニオンの還元においてはモデル系と遜色がなかった。固体Seの減少も速やかであり、気体回収時(48h)における固体Seは12.7%であるものの、144時間目には4.0%まで減少しており、モデル系における4.0%と同じ水準であると言える。一方で、液体Seの含有量が非常に高く、気体回収時(48h)における液体Seは49.5%で、144時間目でも53.9%となり、モデル系の10.5%に比べ非常に高くなっている。

20

【0122】

以上の結果から、気体Seの回収率低下は、固体Seからのメチル化による揮発化において、液中に未同定のSeが残存していることに起因していると考えられる。この原因としては、溶液試料中に残存している廃棄物由来の元素が影響している可能性が考えられる。

【0123】

【表16】

表16 気体回収時の各相の収量

項目名	液体	固体	気体	合計
mmol/L	0.260	0.067	0.111	0.438
%	49.5	12.7	21.1	83.3

(38°C, pH9.0, 1 L/min, 250rpm, 48h)

30

補正計算後の各相の収量

項目名	液体	固体	気体(補正)	合計
mmol/L	0.260	0.067	0.136	0.463
%	49.5	12.7	27.3	89.6

(38°C, pH9.0, 1 L/min, 250rpm, 48h)

\* 硝酸によるメチル化セレンのトラップ効率(81.3%)から算出

40

【0124】

実施例6:

上記の実施例において生成した元素態セレンの写真を図40に示す。

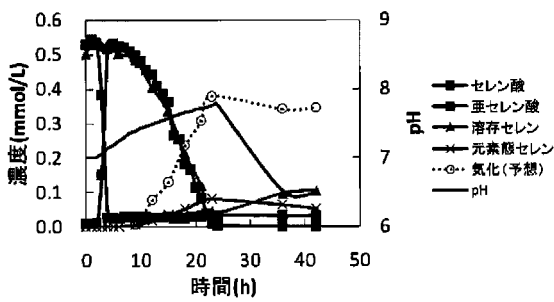
【0125】

50

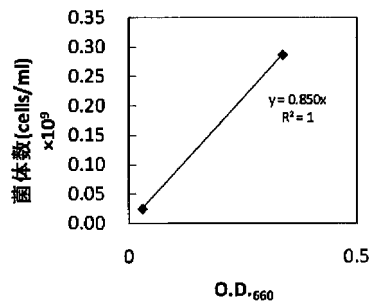
実施例 7 : CIGS太陽電池粉末からのレアメタル回収試算

CIGS太陽電池粉末からのレアメタル回収試算を図 4 1 に示す。

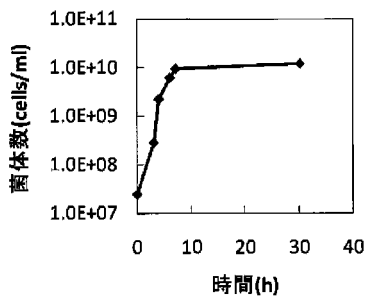
【 図 1 】



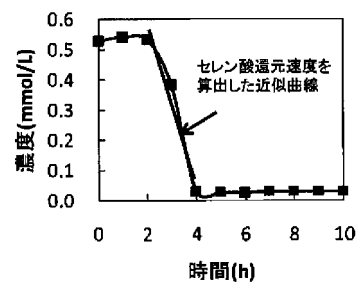
【 図 3 】



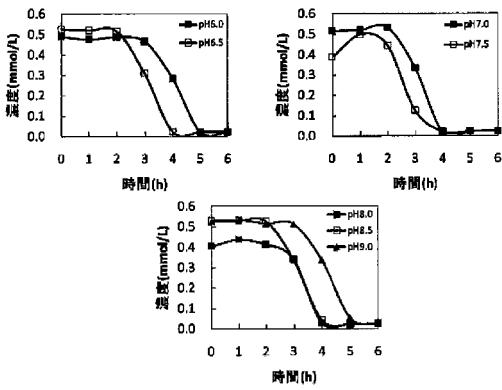
【 図 2 】



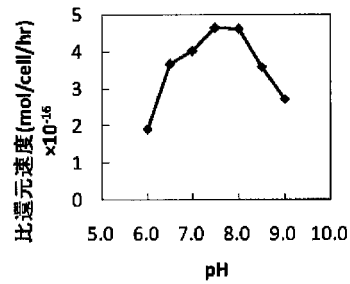
【 図 4 】



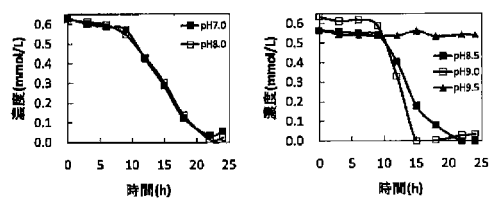
【 図 5 】



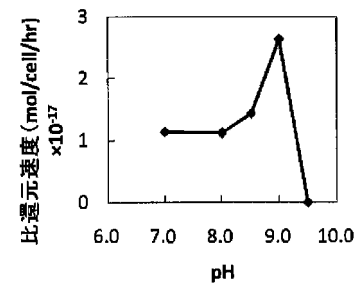
【 図 6 】



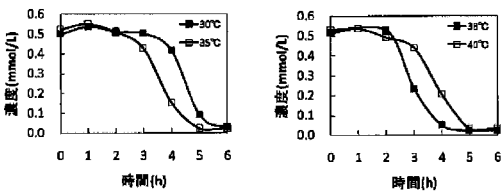
【 図 7 】



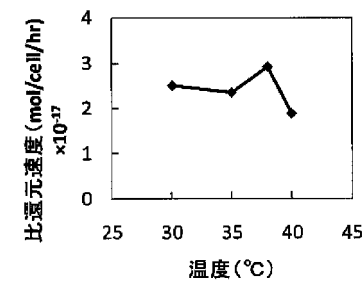
【 図 8 】



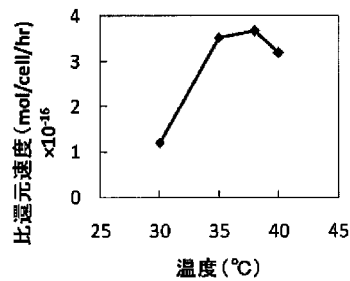
【 図 9 】



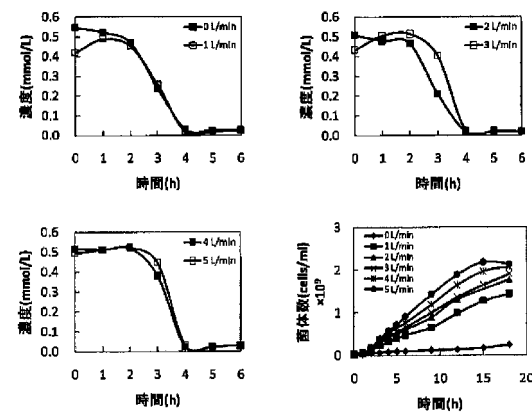
【 図 1 2 】



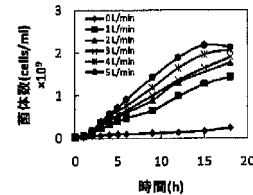
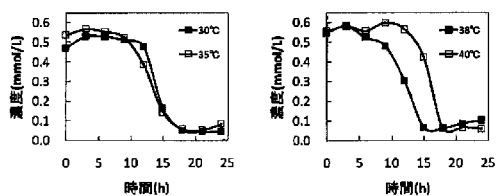
【 図 1 0 】



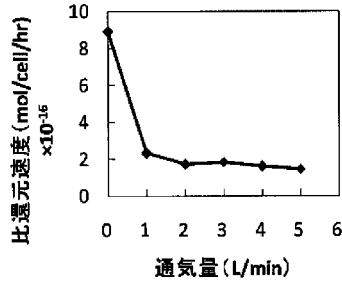
【 図 1 3 】



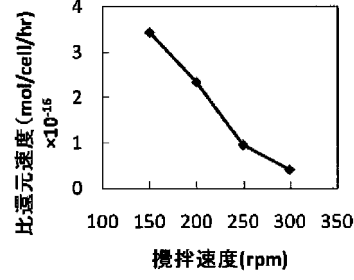
【 図 1 1 】



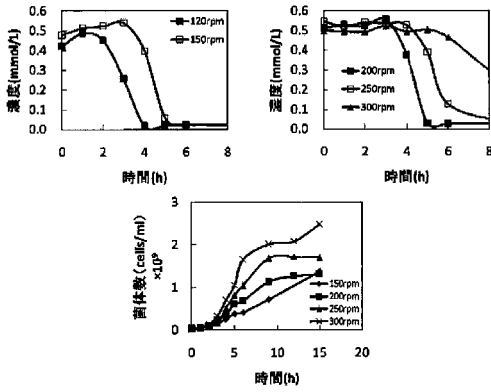
【 図 1 4 】



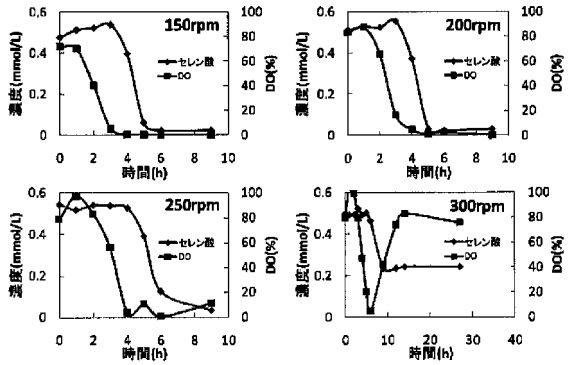
【 図 1 6 】



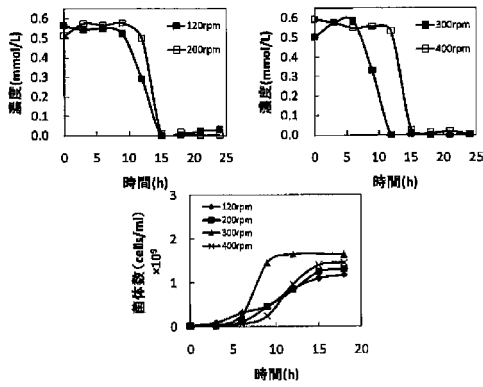
【 図 1 5 】



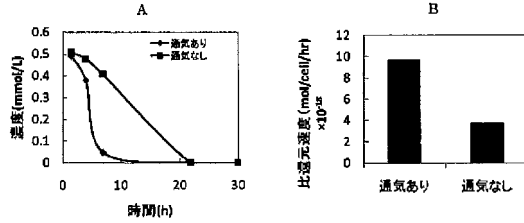
【 図 1 7 】



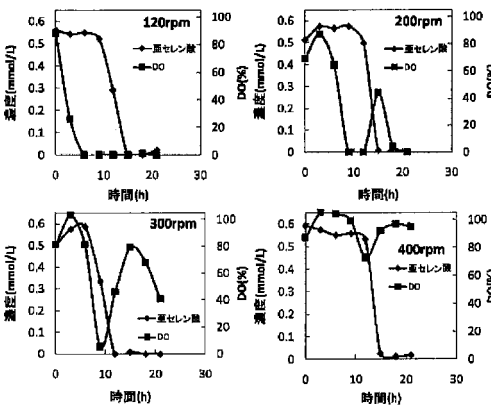
【 図 1 8 】



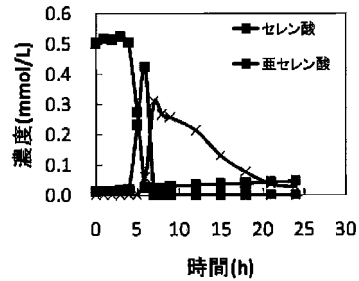
【 図 2 0 】



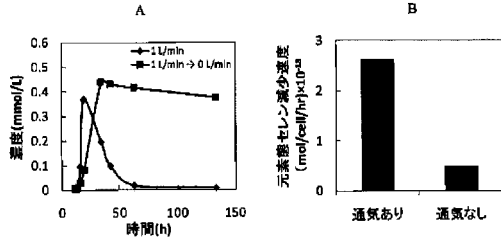
【 図 1 9 】



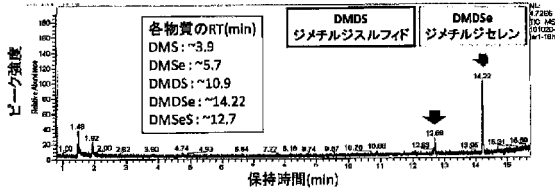
【 図 2 1 】



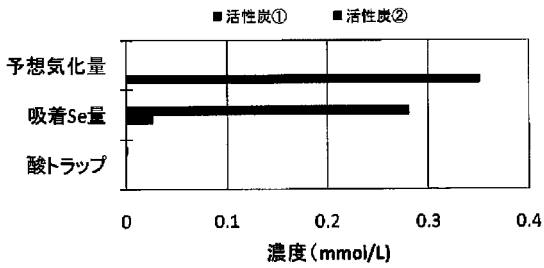
【 図 2 2 】



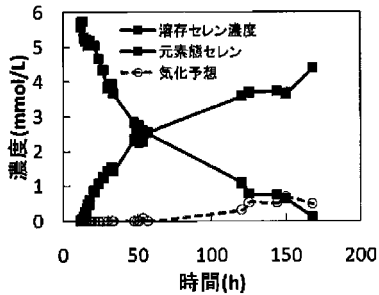
【 図 2 3 】



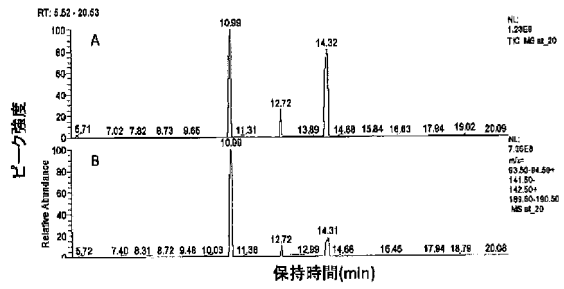
【 図 2 6 】



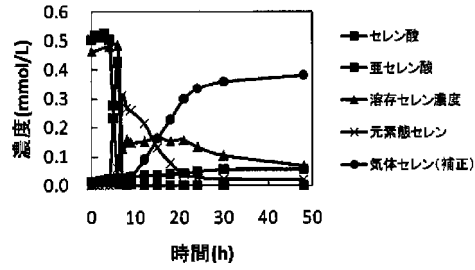
【 図 2 7 】



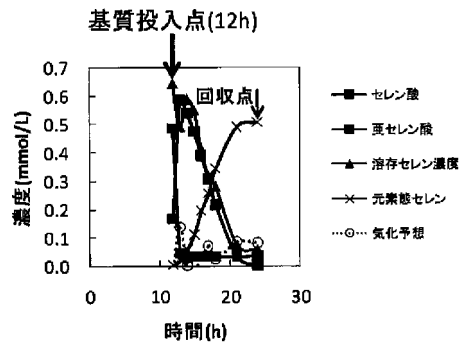
【 図 2 4 】



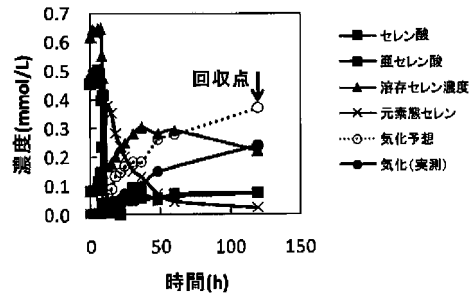
【 図 2 5 】



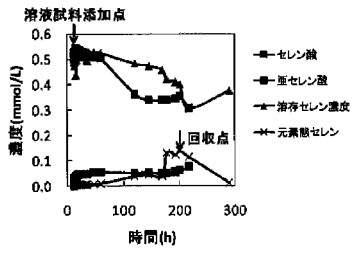
【 図 2 8 】



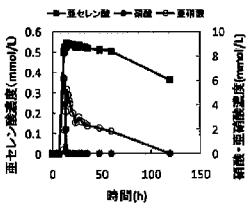
【 図 2 9 】



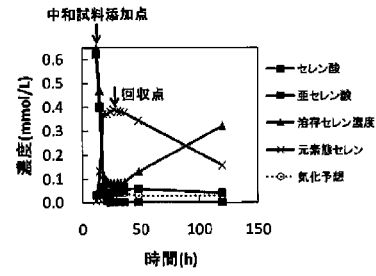
【 図 3 0 】



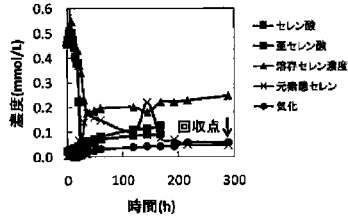
【 図 3 1 】



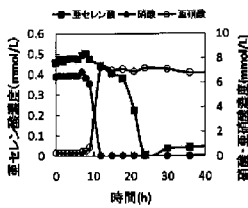
【 図 3 2 】



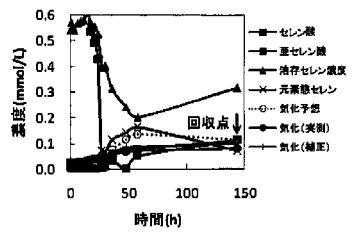
【 図 3 3 】



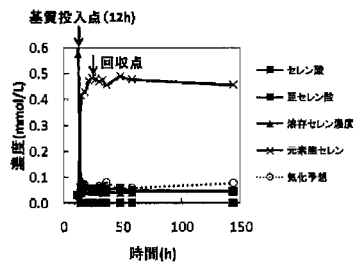
【 図 3 4 】



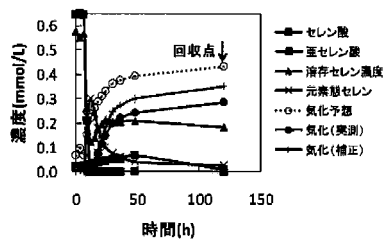
【 図 3 5 】



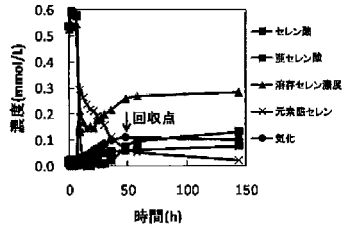
【 図 3 7 】



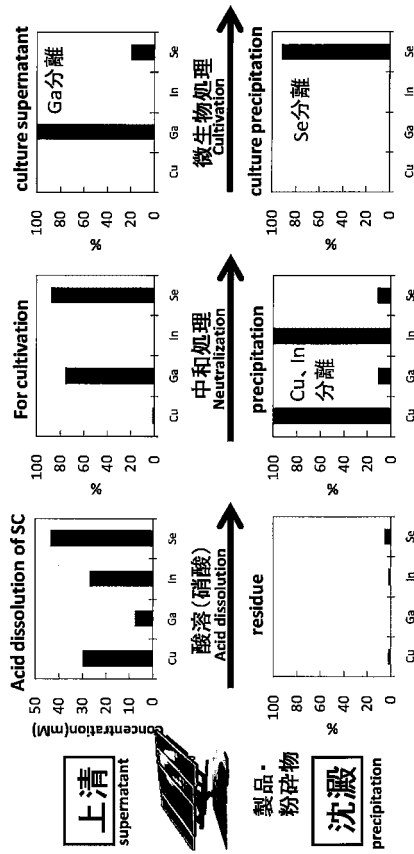
【 図 3 6 】



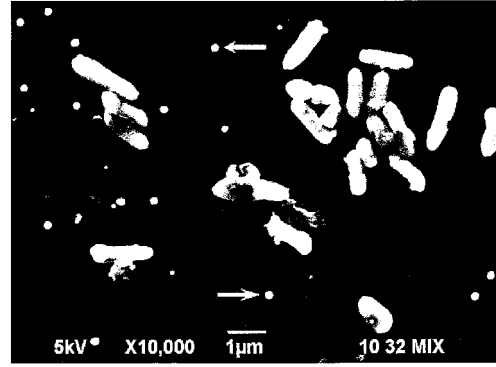
【 図 3 8 】



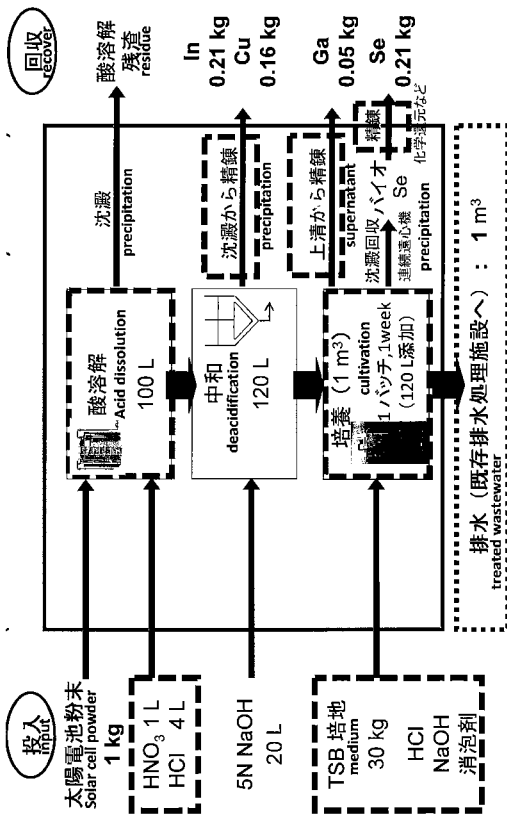
【 図 3 9 】



【 図 4 0 】



【 図 4 1 】





## 【手続補正書】

【提出日】平成25年9月10日(2013.9.10)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

(削除)

【請求項2】

(削除)

【請求項3】

(削除)

【請求項4】

(削除)

【請求項5】

水溶性セレン化合物を含む試料を、水溶性セレン化合物を還元して気体セレンを生成できる能力を有する微生物としての *Pseudomonas stutzeri* NT-I株 (受託番号NITE BP-685) と温度35~40 及びpH7.0~9.4の条件下で1L/分~5L/分の通気条件下かつ攪拌速度250rpm以下の攪拌条件下において接触させることにより水溶性セレン化合物を還元して気体セレンを生成させ、生成した気体セレンを硝酸に通すことによりトラップして回収することを含む、セレンの回収方法。

【請求項6】

水溶性セレン化合物を還元して元素態セレンを生成できる能力を有する微生物としての *Pseudomonas stutzeri* NT-I株 (受託番号NITE BP-685) を温度35~40 及びpH7.0~9.4の条件下で1L/分~5L/分の通気条件下かつ攪拌速度250rpm以下の攪拌条件下において培養し、次いで水溶性セレン化合物を含む試料を添加し、その直後に通気を停止して培養することにより生成した元素態セレンを回収することを含む、セレンの回収方法。

【請求項7】

(削除)

【請求項8】

(削除)

【請求項9】

水溶性セレン化合物がセレン酸又は亜セレン酸である、請求項5又は6に記載の方法。

【請求項10】

(削除)

【請求項11】

(削除)

【請求項12】

水溶性セレン化合物を含む試料中におけるセレン濃度が100~6000 $\mu\text{mol/L}$ である、請求項5、6又は9の何れか1項に記載の方法。

【請求項13】

水溶性セレン化合物を含む試料が、セレン含有材料を前処理することにより得られる試料である、請求項5、6、9又は12の何れか1項に記載の方法。

【請求項14】

水溶性セレン化合物を含む試料が、セレン含有材料を無機酸に溶解することにより得られる試料である、請求項13に記載の方法。

## 【請求項 15】

水溶性セレン化合物を含む試料が、セレン含有材料を無機酸に溶解し、次いでアルカリ水溶液で中和することにより得られる試料である、請求項 13 又は 14 に記載の方法。

## 【請求項 16】

セレン含有材料が、銅 (Cu)、インジウム (In)、及びセレン (Se) を含む材料である、請求項 13 から 15 の何れか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 17】

セレン含有材料が、銅 (Cu)、インジウム (In)、ガリウム (Ga) 及びセレン (Se) を含む材料である、請求項 13 から 16 の何れか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 18】

セレン含有材料が、パネル材料である、請求項 13 から 17 の何れか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 19】

セレン含有材料が、太陽電池パネルである、請求項 13 から 18 の何れか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 20】

(削除)

## 【請求項 21】

(削除)

## 【請求項 22】

(削除)

## 【請求項 23】

(削除)

## 【請求項 24】

(削除)

## 【請求項 25】

(削除)

## 【請求項 26】

(削除)

## 【請求項 27】

(削除)

## 【請求項 28】

(削除)

## 【請求項 29】

*Pseudomonas stutzeri* NT-I 株 (受託番号 NITE BP-685) を温度 37 ~ 39 及び pH 8.0 ~ 9.0 の条件下で培養する、請求項 5、6、9、12 から 19 の何れか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 30】

*Pseudomonas stutzeri* NT-I 株 (受託番号 NITE BP-685) と温度約 38 及び pH 約 9.0 の条件下で培養する、請求項 5、6、9、12 から 19 又は 29 の何れか 1 項に記載の方法。

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/052922

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12P3/00(2006.01)i, C02F3/34(2006.01)n		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12P3/00, C02F3/34		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2012 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2012 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2012		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JST7580 (JDreamII), CA/BIOSIS/WPIDS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> <u>Y</u> A	L. LORTIE et al., Reduction of Selenate and Selenite to Elemental Selenium by a Pseudomonas stutzeri Isolate, Appl Environ Microbiol., 1992, 58(12), p.4042-4044.	1-4, 6-8, 10-13 <u>1-8, 10-28</u> 9
<u>X</u> <u>Y</u> A	JP 10-084948 A (Asahi Glass Co., Ltd.), 07 April 1998 (07.04.1998), claims 3, 5; paragraph [0015]; examples (Family: none)	1-2, 6-13 1-8, 10-23, <u>25-28</u> 24
<u>Y</u> A	Emi NOTAGUCHI et al., "Koki Jokenka ni Okeru Pseudomonas stutzeri NT-I no Selenium Kangen Tokusei", Japanese Journal of Water Treatment Biology, 2008, separate volume, no.28, page 15	<u>1-8, 10-28</u> 9
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 23 March, 2012 (23.03.12)	Date of mailing of the international search report 03 April, 2012 (03.04.12)	
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer	
Facsimile No.	Telephone No.	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/052922

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>Y</u> A	JP 2011-063882 A (Solar Applied Materials Technology Corp.), 31 March 2011 (31.03.2011), claim 1; paragraph [0002] & US 2010/0329970 A1 & EP 2298942 A1	<u>14-28</u> 1-13
<u>X</u> <u>Y</u> A	Masashi KURODA et al., Characterization of Pseudomonas stutzeri NT-I capable of removing soluble selenium from the aqueous phase under aerobic conditions, Journal of Bioscience and Bioengineering, 2011.06.14, 112(3), p.259-264	<u>1-8, 10-13</u> <u>5, 14-28</u> 9

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/052922

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:  
See extra sheet.

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2012/052922

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

A common technical feature among the inventions described in claims 1-28 resides in a matter that a sample containing a water-soluble selenium compound is brought into contact with a microorganism capable of reducing a water-soluble selenium compound to generate element selenium or selenium gas, thereby reducing the water-soluble selenium compound. However, the feature is not novel, and therefore cannot be regarded as a special technical feature.

Thus, the inventions described in claims 1-28 are classified into the following two groups of inventions.

Invention 1: The inventions wherein the sample containing the water-soluble selenium compound is produced by dissolving a selenium-containing material in an inorganic acid.

Invention 2: The inventions wherein the selenium-containing material is a material containing copper, indium and selenium.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 2 / 0 5 2 9 2 2									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12P3/00(2006.01)i, C02F3/34(2006.01)n											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12P3/00, C02F3/34											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2012年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2012年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2012年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2012年	日本国実用新案登録公報	1996-2012年	日本国登録実用新案公報	1994-2012年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2012年										
日本国実用新案登録公報	1996-2012年										
日本国登録実用新案公報	1994-2012年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JST7580 (JDreamII) CA/BIOSIS/WPIDS (STN)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
<u>X</u> <u>Y</u> A	L. LORTIE et al., Reduction of Selenate and Selenite to Elemental Selenium by a Pseudomonas stutzeri Isolate, Appl Environ Microbiol., 1992, 58(12), p.4042-4044.	1-4, 6-8, <u>10-13</u> <u>1-8, 10-28</u> 9									
<u>X</u> <u>Y</u> A	JP 10-084948 A (旭硝子株式会社) 1998.04.07, 請求項3、5、0 015段落、実施例 (ファミリーなし)	<u>1-2, 6-13</u> 1-8, 10-23, <u>25-28</u> 24									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。									
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献									
国際調査を完了した日 23.03.2012		国際調査報告の発送日 03.04.2012									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 田中 晴絵	4 N 9739								
		電話番号 03-3581-1101	内線 3488								

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 2 / 0 5 2 9 2 2
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
<u>Y</u> A	野田口恵美他, 好気条件下における <i>Pseudomonas stutzeri</i> NT-I のセレン還元特性, 日本水処理生物学会誌, 2008, 別巻, 第 2 8 号, 1 5 頁	<u>1-8, 10-28</u> 9
<u>Y</u> A	JP 2011-063882 A (光洋応用材料科技股ふん有限公司) 2011. 03. 31, 請求項 1、0 0 0 2 段落 & US 2010/0329970 A1 & EP 2298942 A1	<u>14-28</u> 1-13
<u>X</u> <u>Y</u> A	Masashi KURODA et al., Characterization of <i>Pseudomonas stutzeri</i> NT-I capable of removing soluble selenium from the aqueous phase under aerobic conditions, Journal of Bioscience and Bioengineering, 2011. 06. 14, 112(3), p. 259-264	<u>1-8, 10-13</u> <u>5, 14-28</u> 9



国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 2 / 0 5 2 9 2 2

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求項 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、
2.  請求項 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3.  請求項 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。  
特別ページ参照。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(2)) (2009年7月)

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2012/052922

請求項1～28に係る発明に共通する技術的特徴は、水溶性セレン化合物を含む試料を、水溶性セレン化合物を還元して元素態セレンまたは気体セレンを生成できる能力を有する微生物と接触させることにより、水溶性セレン化合物を還元することであるが、当該特徴は、新規ではないから、当該特徴は特別なものとは認めることができない。

したがって、請求項1～28に係る発明は、下記の通り、2つの発明群に区分される。

発明1：水溶性セレン化合物を含む試料が、セレン含有材料を無機酸に溶解することにより得られるものである発明

発明2：セレン含有材料が、銅、インジウム、及びセレンを含む材料である発明

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN

(出願人による申告) 国等の委託研究の成果に係る特許出願(平成21年度経済産業省産業技術研究開発委託事業(レアメタル抽出技術開発)、産業技術力強化法第19条の適用を受けるもの)

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。