

KOMMISSIONENS FORORDNING (EØF) Nr. 3220/90

af 7. november 1990

om betingelserne for anvendelse af visse ønologiske fremgangsmåder, der er
fastsat i Rådets forordning (EØF) nr. 822/87

KOMMISSIONEN FOR DE EUROPÆISKE
FÆLLESSKABER HAR —

under henvisning til Traktaten om Oprettelse af Det
Europæiske Økonomiske Fællesskab,

under henvisning til Rådets forordning (EØF) nr. 822/87
af 16. marts 1987 om den fælles markedsordning for
vin ⁽¹⁾, senest ændret ved forordning (EØF) nr. 1325/90 ⁽²⁾,
særlig artikel 15, stk. 6, og

ud fra følgende betragtninger:

I forordning (EØF) nr. 822/87 er det fastsat, at der fast-
lægges nærmere betingelser for anvendelsen af polyvinyl-
polypyrrolidon og mælkesyrebakterier;

de i denne forordning fastsatte foranstaltninger er i over-
ensstemmelse med udtalelse fra Forvaltningskomitéen for
Vin —

UDSTEDT FØLGENDE FORORDNING:

Artikel 1

1. Der kan kun anvendes polyvinylpolypyrrolidon i medfør af nr. 1, litra p), og nr. 3 litra y), i bilag VI til forordning (EØF) nr. 822/87, hvis stoffet er i overensstemmelse med kravene i bilag I til nærværende forordning.
2. Der kan kun anvendes mælkesyrebakterier i medfør af nr. 1, litra q), og nr. 3, litra z), i bilag VI til forordning (EØF) nr. 822/87, hvis bakterierne er i overensstemmelse med kravene i bilag II til nærværende forordning.

Artikel 2

Denne forordning træder i kraft på tredjedagen efter offentliggørelsen i *De Europæiske Fællesskabers Tidende*.

Den anvendes fra den 1. september 1990.

Denne forordning er bindende i alle enkeltheder og gælder umiddelbart i hver medlemsstat.

Udfærdiget i Bruxelles, den 7. november 1990.

På Kommissionens vegne

Ray MAC SHARRY

Medlem af Kommissionen

⁽¹⁾ EFT nr. L 84 af 27. 3. 1987, s. 1.

⁽²⁾ EFT nr. L 132 af 23. 5. 1990, s. 19.

BILAG I

FORSKRIFTER FOR PVPP

Produktet polyvinylpolypyrrolidon, hvis anvendelse er angivet i nr. 1, litra p), og nr. 3, litra y) i bilag VI til forordning (EØF) nr. 822/87, er en polymer: poly (1. (2-oxo-1-pyrrolidinethylen)), statisk krydsbundet.

Det fremstilles ved polymerisering af N-vinyl-2-pyrrolidon i tilstedeværelse af en katalysator, enten natriumhydroxid eller en N,N'-divinylimidazolidon.

EGENSKABER

Let pulver, hvidt eller flødefarvet.

Uopløseligt i vand og organiske opløsningsmidler.

Uopløseligt i base og stærk mineralisk syre.

PRØVNINGER

1. Tab ved tørring

Mindre end 5 % under følgende betingelser: 2 g PVPP anbringes i en 70 mm Ø kvartsdigel. Tørres i 6 timer i varmeskab ved 100 til 105° C. Afkøles i en eksikator og vejes.

NB: Alle nedennævnte fastsatte grænser er tilbageført til det tørrede produkt.

2. Aske

Vægt af aske mindre end 0,5 % under følgende betingelser:

Resten fra nr. 1 foraskes fuldstændigt ved en temperatur, der ikke overstiger 500 til 550° C, og vejes.

3. Arsen

Mindre end 2 ppm under følgende betingelser:

Forbehandling af prøven:

Indsæt 0,5 g PVPP i en rundbundet kolbe af borsilicateglas, lagt på en hulplade med halsen holdt skråt.

Tilsæt 5 ml ren svovlsyre (analyseren) og 10 ml ren salpetersyre (analyseren) og varm langsomt op. Når blandingen begynder at blive brun, tilsættes en lille mængde salpetersyre, samtidig med at opvarmningen fortsættes. Gentag operationen indtil væsken forbliver farveløs, og kolben fyldes med hvide dampe af SO₂. Afkøl, tilsæt 10 ml vand og opvarm på ny, indtil hvide dampe atter ses, for at fjerne nitroser dampe. Gentag operationen yderligere to gange. Efter tredje gang, koges blandingen et øjeblik, afkøles og fortyndes til 40 ml med vand.

Reagenser (analyserene)

1. Koncentreret arsenholdig opløsning (svarende til 100 mg As/l)

Afvej nøjagtigt 0,132 g arsentrioxid, som i forvejen er tørret ved 100° C, og hæld stoffet i en 500 ml konisk kolbe. Tilsæt 3 ml vandig natriumhydroxid og 20 ml vand. Omrystes indtil alt stof er opløst. Neutraliser arsenikopløsningen med 15 ml fortyndet svovlsyre 10 % (w/w), og tilsæt mættet bromvand (R) indtil blivende gulfarvning af fri brom (teoretisk: 7 ml). Bringes op til kogepunktet for at fjerne bromoverskuddet, overfør blandingen til en udmålt målekolbe på 1 000 ml og fyld op til strengen med destilleret vand.

2. Fortyndet arsenikopløsning (1 mg As/l)

Følgende blanding fremstilles:

Koncentreret arsenikopløsning med 100 mg As/l: 10⁴ ml

Destilleret vand til totalvolumen: 1 000 ml.

1 ml af denne opløsning indeholder 1 µg arsen.

3. Blyacetatbomuld

Læg noget vandsugende vat ned i en 5 % blyacetatopløsning (w/v) tilsat 1 % eddikesyre. Lad bomulden dryppe af og lad den tørre i fri luft. Opbevares i en tæt, lukket flaske.

4. Tør vandsugende vat, tørret ved 100° C

Opbevares i en tæt, lukket flaske.

5. Papir med kviksølv(I)-bromid

I et rektangulært fad hældes en 5 % opløsning af kviksølv(I)-bromid i alkohol. I denne opløsning neddyppes hvidt filterpapir, 80 g/m², der er klippet i stykker på 15 × 22 cm og foldet på midten. Lad papiret dryppe af og lad det tørre i mørke over en tråd, som ikke er af metal. Klip papiret af 1 cm under folden samt 1 cm over bundkanten. Klip papiret ud i små firkanter på 15 × 15 mm. Opbevares i en tæt, lukket flaske, der er omviklet med sort papir.

6. Tinchloridopløsning

Behandl 20 g kold, analyseren tingranulat med 100 ml ren saltsyre, d = 1,19. Opbevares lufttæt over metallinsk tin i en kolbe med ventilprop.

7. Kaliumiodidopløsning

Kaliumiodid 10 g
Vand til totalvolumen 100 ml.

8. Salpetersyre til undersøgelse af arsen (analysen)

Syre med en vægtfylde på 1,38 ved 20° C indeholdende 61,5 til 65,5 % salpetersyre (HNO_3). Den må ikke efterlade mere end 0,0001 % bundfald. Den må ikke indeholde bly, som kan afsløres med dithizon, heller ikke over 1 ppm chlorationer, over 2 ppm sulfationer, over 2 ppm orthophosphationer, ej heller over 10 ppb arsen.

9. Svovlsyre til undersøgelse af arsen (analysen)

Syre med vægtfylde 1,831 til 1,835 ved 20 % volumen, indeholdende mindst 95 % svovlsyre (H_2SO_4). Den må ikke efterlade mere end 0,0005 % bundfald. Den må ikke indeholde mere end 2 ppm tungmetaller, 1 ppm jern, 1 ppm chlorationer, 1 ppm nitrationer, 5 ppm ammoniumioner og 20 ppb arsen.

10. Svovlsyreopløsning à 20 % (v/v)

(36 g H_2SO_4 pr. 100 ml)

Blanding:

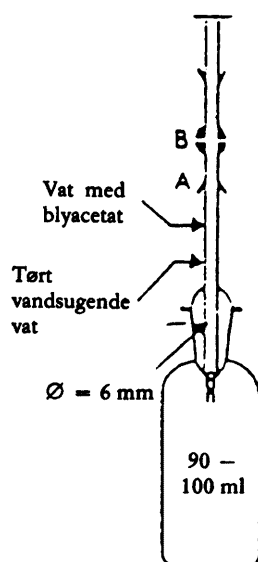
ren svovlsyre (analysen)	200 ml
destilleret vand til totalvolumen	1 000 ml.

11. Platineret zink

Ren, arsenfri zink, som granulat eller i stænger. Zinken platineres ved at sætte den i et bægerglas og dække den med en 50 ppm platinchloridopløsning. Efter 2 timers behandling skylles zinken med destilleret vand, og den platinerede zink aftørres med et flerlags trækpapir. Lad det tørre og opbevar det derefter i en tør flaske.

Det skal kontrolleres, at 5 g af denne zink, placeret i det nedenfor beskrevne apparat, sammen med 4,5 ml ren svovlsyre fortyndet til 40 ml med vand, hvortil man derefter tilsætter to dråber tinchlorid samt 5 ml 10 % kaliumiodidopløsning, ikke giver nogen plet på kviksølv(I)-bromidpapiret efter mindst 2 timer. Ligeledes skal man kontrollere, at 1 g arsen, anvendt som beskrevet nedenfor, viser en betragtelig plet.

Apparatbeskrivelse



Anvend en 90 til 100 ml kolbe, der er lukket med en glasprop forsynet med et glasrør, der er 6 mm Ø indvendig og 90 mm langt. Rørets nederste del er spidset og forsynet med et sidehul (til forebyggelse af stødskogning). Den øverste del afsluttes med en slebet flade, vinkelret på rørets længderetning. Et andet glasrør med samme indvendige diameter og 30 mm langt, afsluttet med samme type slebet flade som ovennævnte, kan tilsluttes det første rør og holdes på plads ved hjælp af to spiralfjedre eller to gummiringe (jf. figur 2).

Fremgangsmåde

Tilsæt i udgangsrøret ved A en prop tørt vandsugende vat og derefter en blyacetat vatprop.

Sæt ved punkt B et stykke papir med kviksølv(I)-bromid mellem glasrørene og forbind de to rør.

I kolben hældes de ovennævnte 40 ml svovlsyre, to dråber tinchloridopløsning og 5 ml kaliumiodidopløsning. Vent 15 minutter. Tilsæt 5 g platinzink og prop omgående kolben til med det i forvejen samlede glasrør.

Lad reaktionen fortsætte indtil afslutning (mindst 2 timer). Afmonter apparatet og dyp kviksølv(I)-bromidpapiret i 10 ml kaliumiodidopløsning i en 1/2 time og omryst af og til. Skyl grundigt og lad det tørre.

Den brune eller gule plet skal være usynlig eller svagere end den, man kan opnå ved en parallelprøve, der udføres med 1 ml arsenopløsning à 1 µg/ml, tilsat 4,5 ml ren svovlsyre og fortyndet til 40 ml med vand, hvori man derefter tilsætter to dråber tinchloridopløsning samt 5 ml 10 % kaliumiodidopløsning.

4. Tungmetaller

Udtrykt i bly, mindre end 20 ppm under følgende betingelser :

Opløs asken efter vejningen i 1 ml ren saltsyre og 10 ml destilleret vand. Varm for at fremskynde opløsningen. Fyld op til 20 ml med destilleret vand. 1 ml af denne opløsning indeholder mineralstofferne fra 0,10 g PVPP.

Hæld 10 ml af denne askeopløsning i et 160 × 16 mm reagensglas, med 2 ml 4 % analysen natriumfluoridopløsning, 0,5 ml analysen ammoniumhydroxid, 3 ml vand, 0,5 ml analysen eddikesyre og 2 ml mættet vandig svovlbrinteopløsning.

Der må ikke dannes bundfald. Hvis der opstår brunfarvning, skal den være svagere end den, som påvises af følgende kontrolprøve :

I et 160 × 16 mm reagensglas hældes 2 ml af en opløsning, som indeholder 0,01 g bly (Pb) pr. l (10 mg Pb/l), 15 ml vand, 0,5 ml 4 % natriumfluorid (w/v), 0,5 ml analysen eddikesyre og 2 ml mættet, vandig svovlbrinte. Reagensglasset indeholder 20 µg bly.

NB :

Ved denne koncentration bundfældes blyulfid kun i edikesurt miljø. Man kunne opnå bundfældning i nærværelse af kun 0,05 ml saltsyre pr. 15 ml, men denne koncentration er i praksis for vanskelig at styre nøjagtigt.

Ved at erstatte de nævnte 0,5 ml eddikesyre med 0,5 ml saltsyre ville man kun bundfælde kobber, kviksølv, osv.

Jern, som kan være tilstede, normalt som jern (III)-forbindelser, oxiderer svovlbrinte og giver et svovlbundfald, som skjuler det kolloide bundfald af blyulfid. I tilstedeværelse af 0,5 ml natriumfluorid oxiderer jern kun langsomt svovlbrinte.

Denne dosis er tilstrækkelig for at complexbinde 1 mg jern (III). Hvis der findes mere jern, forøges mængden af natriumfluorid.

Produkter, som indeholder calcium, skal filtreres efter tilsætningen af fluorid.

5. Total kvælstof

Mellem 11 og 12,8 % under følgende betingelser :

Apparatet

A. Apparatet består af følgende elementer :

1. 1 stk. 1 l kolbe A i borosilikatglas som kogekolbe, forsynet med en tragt med spærrehane til fyldningen. Kan opvarmes med gas eller el.
2. En forlænger C som anvendes til opsamlingen af den udtømte væskerest, der kommer fra absorptionskolben B.
3. En 500 ml absorptionskolbe B med skrå hals. Indgangsrøret skal nå ned til den laveste del af ballonen. Afgangsrøret er påsat et sprøjtfang og danner den øverste del af absorptionskolben. En tilføjet tragt med spærrehane muliggør indførelse af væsken, som skal behandles, samt den alkaliske lud.
4. En 30 til 40 cm lodretstående svaler afsluttet i en kugle med spids fatning.
5. En 250 ml konisk kolbe til opsamling af destillatet.

B. Oval 300 ml destillationskolbe med lang hals til mineraliseringen.

Nødvendige produkter

Ren svovlsyre

Mineraliseringskatalysator

30 % natriumhydroxid (w/w)

40 % ren borsyreopløsning (w/v)

Saltsyreopløsning 0,1 N

Blandet indikator : bromcresolgrønt og methylrødt.

Kogekolben fyldes med vand, som er gjort svagt surt med 1 ‰ svovlsyre. Denne væske skal før hver analyse koges med åben udluftningshane P for at fjerne CO₂.

Fremgangsmåde

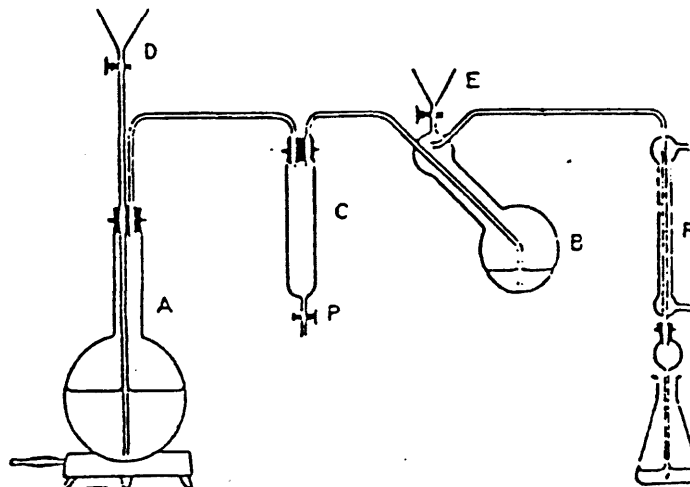
Afvej 0,20 g PVPP nøjagtigt i destillationskolben. Tilsæt 2 g katalysator og 15 ml ren svovlsyre. Opvarm på flamme, mens glashalsen holdes i skrå stilling, indtil opløsningen bliver farveløs og glassets vægge frie for forskede stoffer.

Efter nedkøling fortyndes med 50 ml vand og afkøles. Tilsæt denne væske til absorptionskolben B ved hjælp af tragten E. Tilsæt derefter 40 til 50 ml 30 % natriumhydroxid for at opnå øjeblikkelig basisk reaktion og dampdestiller den dannede ammoniak over 5 ml borsyreopløsning, som i forvejen er anbragt i den koniske modtagerkolbe sammen med 10 ml vand og med spidsen af røret under væskeoverfladen. Der tilsættes en til to dråber blandet indikator og opsamles 70 til 100 ml destillat.

Destillatet titreres med 0,1 N saltsyreopløsning, indtil indikatoren slår om til rosa-violet.

1 ml 0,1 N saltsyreopløsning svarer til 1,4 mg kvælstof.

Apparat til vanddampdestillation
af ammoniak
(Efter Parnas & Wagner)



Hanerne P og E kan erstattes med en plasticforbindelse med en Mohr-klemme.

6. Opløselighed i vandigt miljø

Mindre end 0,5 % under følgende betingelser:

Overfør 10 g PVPP til en 200 ml kolbe, som i forvejen indeholder 100 ml destilleret vand. Omrør blandingen og lad den stå i 24 timer. Filtrér på 2,5 μ skærmfilter og derefter på 0,8 μ filter. Remanensens vægt må, efter at filtratet er inddampet til tørhed, ikke overstige 50 mg.

7. Opløselighed i surt og alkoholisk miljø

Mindre end 1 % under følgende betingelser:

Overfør 1 g PVPP til en kolbe, som indeholder 500 ml af følgende blanding:

Eddikesyre	3 g
Ethanol	10 ml
Vand til totalvolumen	100 ml.

Lad stofferne være i kontakt i 24 timer. Filtrér på 2,5 μ skærmfilter og derefter et 0,8 μ filter. Filtratet koncentrerer på vandbad. Til slut inddampes på vandbadet i en i forvejen vejlet 70 mm Ø kvartsdigel. Remanensen efter inddampningen må højst veje 10 mg under hensyntagen til en eventuel rest fra inddampning af den 500 ml eddikesyreethanolblanding.

8. Virkning af PVPP i forhold til absorption af phenolderivater

Den efter følgende betingelser fundne aktivitet skal være 30 % eller derover.

A. Reagenser

1. Natriumhydroxidopløsning 0,1 N

2. Salicylsyreopløsning 0,1 N

(13,81 g salicylsyre opløst i 500 ml metanol og fortyndet til 1 l med vand).

B. Fremgangsmåde

1. 2 til 3 g PVPP afvejes i en 250 ml erlenmeyer-kolbe og vægten W noteres med 0,001 g nøjagtighed.
2. Beregn tørstofindholdet i prøven, og noter indholdet i procent, P , med en decimals nøjagtighed.
3. Tilsæt væsken 0,1 N salicylsyreopløsning i henhold til følgende formel:

$$43 \times W \times P = \text{antal ml, der skal tilsættes.}$$
4. Kolben lukkes og omrystes i 5 minutter.
5. Hæld ved 25°C blandingen i en tragt med filter monteret på et Buchner-rør forbundet til en 250 ml kolbe. Sæt vacuum på, indtil der opnås filtrat nok til udtagning af 50 ml (filtratet skal være klart).
6. 50 ml filtrat udtages med pipette og overføres til en 250 ml erlenmeyer-kolbe.
7. Ækvivalenspunktet bestemmes med 0,1 N natriumhydroxidopløsning og phenolphthalein, og volumen V_b noteres.
8. Titrer på samme måde 50 ml salicylsyreopløsning (kontrolprøve), og volumen V_s noteres.

C. Beregning:

$$\% \text{ aktivitet} = \frac{V_b - V_s}{V_b} \times 100$$

NB:

Alle de i punkt 2 til 8 nævnte grænser er tilbageført til det tørrede produkt.

9. Fri N-vinylpyrrolidon — Må ikke overstige 0,1 %*Fremgangsmåde*

4,0 g prøve opslæmmes i 30 ml vand, omrystes i 15 minutter og hældes i en 250 ml kolbe igennem et filter med frittet glasplade på 9 til 15 μm (type G4). Afvask denne rest med 100 ml vand, tilsæt 500 mg natriumacetat til de samlede filtrater og tildryp 0,1 N iod indtil vedvarende iodfarvning. Tilsæt endnu 3 ml 0,1 N iod, lad blandingen hvile i 10 minutter, og fjern overskydende iod med 0,1 N natriumhyposulfit. Tilsæt 3 ml tivelse (analyserent) indtil begyndende farveskift. En blindprøve udføres. Iodforbruget må ikke overstige 0,72 ml, hvilket svarer til maks. 0,1 % vinylpyrrolidon.

10. Fri N,N'-divinylimidazol — Må ikke overstige 2 mg/kg*Princip*

Kvantativ bestemmelse ved hjælp af gaskromatografi på kapillarsøle af den frie N,N'-divinylimidazolidin ekstraheret fra den uopløselige PVP med et opløsningsmiddel (acetone).

Intern standardopløsning

Opløs 100 mg heptansyrenitril (nitril af oenanthsyre), der er vejlet med 0,1 mg nøjagtighed, i 500 ml acetone.

Forberedelse af prøven

Vej 2 til 2,5 g polymer med 0,2 mg nøjagtighed i en 50 ml erlenmeyer-kolbe. Tilsæt med pipette 5 ml intern standardopløsning og 20 ml acetone. Blanding omrystes i 4 timer og skal derefter hvile og stabilisere sig i 15 timer.

Overfladevæsken analyseres ved gaskromatografi.

Standardiseringsopløsningen

Vej 25 mg N,N'-divinylimidazolidin med 0,2 mg nøjagtighed, hæld det i en kolbe og fyld op til 100 ml med acetone. 2 ml af denne opløsning overføres med pipette til en anden 50 ml målekolbe, som fyldes op til 50 ml med acetone. Overfør 2 ml af denne nye opløsning i en anden kolbe, tilsæt 5 ml af den ovenfor beskrevne interne standardopløsning og fyld op til 25 ml med acetone.

Betingelser for gaskromatografi

— Søjlen:

•DB-Wax• (smeltet silicium) kapillar (krydsbundet Carbowax — 20 ml), længde 30 m, indvendig diameter 0,25 mm, filmtykkelse 0,5 μm .

— Programmeret temperaturskala:

140 til 240°C, 4°C pr. minut.

— Injektor:

splitinjektor, 220°C. Splitudstrømning 30 ml.

— Detektor:

termoelektronisk detektor (optimeret i henhold til fabrikantens instruktioner), 250°C.

— Drivgas:

Helium, ved 1 bar (overtryk).

— Injiceret mængde:

1 μl af prøveopløsningens overfladevæske eller af standardiseringsopløsningen.

Fremgangsmåde

Pålidelig bestemmelse af standardiseringsfaktoren for de specifikke analysebetingelser ved hjælp af gentagne injektioner af standardiseringsopløsningen. Analyse af prøven. Indhold af N,N'-divinylimidazolidin i uopløselig PVP må ikke være over 0,1 %.

Beregning af standardiseringsfaktoren :

$$f = \frac{W_d \cdot A_{st}}{W_{st} \cdot A_d}$$

hvor

W_d = anvendt mængde (mg) N,N'-divinylimidazolidin

W_{st} = mængde af intern standardopløsning (mg)

A_{st} = toparealet for den interne standardopløsning

A_d = toparealet for N,N'-divinylimidazolidin.

Beregning af N,N'-divinylimidazolidin indhold

$$C_d = \frac{1\,000 \cdot f \cdot A_d \cdot W_{st}}{A_{st} \cdot W_s} \text{ (mg/kg)}$$

hvor

C_d = koncentration af N,N'-divinylimidazolidin (mg/kg)

f = standardiseringsfaktor

A_d = toparealet for N,N'-divinylimidazolidin

W_{st} = mængde af den interne standardopløsning, som er tilsat prøven (mg)

A_{st} = toparealet for den interne standardopløsning

W_s = anvendt prøvemængde (g).

BILAG II**MÆLKESYREBAKTERIERNE****Forordninger**

Mælkesyrebakterierne, hvis anvendelse er fastsat i nr. 1, litra q) og nr. 3 litra z) i bilag VI til forordning (EØF) nr. 822/87, skal høre til slægterne *Leuconostoc*, *Lactobacillus* og/eller *Pediococcus*. De skal kunne omdanne æblesyren fra vin eller druesaft til mælkesyre uden at forårsage smagsfejl.

De skal være isoleret fra druer, druesafter, vine eller produkter, som er fremstillet på druebasis. Navnet på deres art og slægt, samt deres stamme skal fremgå af mærkesedlen, ligesom oprindelsen og udvælgeren af denne stamme.

Før udførelse af genteknologi på mælkesyrebakterierne skal der indhentes en speciel tilladelse.

Tilstand

De anvendes enten i væskeform eller i frossen tilstand, og/eller i pulverform opnået ved frysetørring som renkultur eller som sammensat kultur.

Immobiliserede bakterier

Bærestoffet til fremstilling af immobiliserede mælkesyrebakterier skal være inert og tilladt til anvendelse i vinfremstilling.

Kontrolformer

— Kemisk kontrol:

Samme krav for de undersøgte stoffer som for andre ønologiske præparater, specielt for tungmetaller.

— Mikrobiologisk kontrol:

- indholdet af formeringsdygtige mælkesyrebakterier skal være over eller lige 10^6 /g eller 10^7 /ml
- indholdet af mælkesyrebakterier af anden art end de ovenfor nævnte stammer skal være mindre end 0,01 % af det totale antal formeringsdygtige mælkesyrebakterier
- indholdet af aerobe bakterier skal være mindre end 10^3 pr. g pulver eller pr. ml
- det totale indhold af gær skal være mindre end 10^3 pr. g pulver eller pr. ml
- indholdet af skimmel skal være mindre end 10^3 pr. g pulver eller pr. ml.

Tilsætningsstoffer

De anvendte tilsætningsstoffer til forberedelse af mælkesyrebakteriekulturer eller til deres reaktivering skal være tilladte stoffer til anvendelse i næringsmidler og skal anføres på mærkesedlen.

Fremstillingsdato

Udgangsdatoen fra produktionsstedet skal fremgå af mærkesedlen.

Anvendelse

Fremgangsmåden eller reaktiveringsmetoden skal meddeles af fabrikanten.

Konservering

Konserveringsbetingelserne skal tydeligt fremgå af mærkesedlen.

Analysemetoder

- mælkesyrebakterier på substrat A⁽¹⁾, B⁽²⁾ eller C⁽³⁾ med den metode for anvendelse af stammen, som er anbefalet af fabrikanten
- aerobe bakterier: substrat Bacto-Agar
- gær: substrat Malt-Wickerham
- skimmel: substrat Malt-Wickerham eller Czapeck.

(¹) Gærekstrakt	5	g
Kødekstrakt	10	g
Tryptisk pepton	15	g
Natriumacetat	5	g
Ammoniumcitrat	2	g
Tween 80	1	ml
Mangansulfat	0,050	g
Magnesiumsulfat	0,200	g
Glucose	20	g
Vand til totalvolumen	1 000	ml
pH	5,4.	
(²) Tomatsaft	250	ml
Gærekstrakt Difco	5	g
Pepton	5	g
L-æblesyre	3	g
Tween 80	1 dråbe	
Magnesiumsulfat	0,050	g
Mangansulfat	0,050	g
Vand til totalvolumen	1 000	ml
pH	4,8.	
(³) Glucose	5	g
Trypton Difco	2	g
Pepton Difco	5	g
Leverekstrakt	1	g
Tween 80	0,05	g
Tomatsaft, 4,2 gange fortyndet, filtreret på Whatman nr. 1	1 000	ml
pH med PO ₄ H ₃ eller KOH	5,5	
Glucose	20	g.