

390R3220

Nr L 308/22

EUROPEISKA GEMENSKAPERNAS OFFICIELLA TIDNING

8.11.90

## KOMMISSIONENS FÖRORDNING (EEG) nr 3220/90

av den 7 november 1990

## om villkor för användning av vissa enologiska metoder som fastställs i rådets förordning (EEG) nr 822/87

EUROPEISKA GEMENSKAPERNAS KOMMISSION  
HAR ANTAGIT DENNA FÖRORDNING

HÄRIGENOM FÖRESKRIVS FÖLJANDE.

*Artikel 1*

med beaktande av Fördraget om upprättandet av Europeiska ekonomiska gemenskapen,

med beaktande av rådets förordning (EEG) nr 822/87 av den 16 mars 1987 om den gemensamma organisationen av marknaden för vin<sup>(1)</sup>, senast ändrad genom förordning (EEG) nr 1325/90<sup>(2)</sup>, särskilt artikel 15.6 i denna, och

med beaktande av följande:

I förordning (EEC) nr 822/87 föreskrivs att villkoren för användning av polyvinylpyrrolidon och mjölksyrabakterier bör fastställas.

De åtgärder som avses i denna förordning är förenliga med yttrandet från Förvaltningskommittén för vin.

1. Polyvinylpyrrolidon, vars användning regleras i bilaga 6.1 p och 6.3 y till förordning (EEG) nr 822/87, får endast användas om det uppfyller kraven i bilaga 1 till den här förordningen.

2. Mjölksyrabakterier, vars användning regleras i bilaga 6.1 q och 6.3 z till förordning (EEG) nr 822/87 får endast användas om de uppfyller kraven i bilaga 2 till den här förordningen.

*Artikel 2*Denna förordning träder i kraft den tredje dagen efter det att den har offentliggjorts i *Europeiska gemenskapernas officiella tidning*.

Den skall tillämpas från och med den 1 september 1990.

Denna förordning är till alla delar bindande och direkt tillämplig i alla medlemsstater.

Utfärdad i Bryssel den 7 november 1990.

*På kommissionens vägnar*

Ray MAC SHARRY

*Ledamot av kommissionen*<sup>(1)</sup> EGT nr L 84, 27.3.1987, s. 1.<sup>(2)</sup> EGT nr L 132, 23.5.1990, s. 19.

## BILAGA 1

## SPECIFIKATIONER FÖR PVPP

Polyvinylpyrrolidon, vars användning regleras i bilaga 6.1 p och 6.3 y till förordning (EEG) nr 822/87, är en polymer med statisk nätstruktur: (poly (1(2-oxo-1-pyrrolidinetylen))).

Den framställs genom polymerisation av N-vinyl-2-pyrrolidon i närvaro av en katalysator, antingen natriumhydroxid eller N,N-divinylimidazolidin.

## EGENSKAPER

Lätt pulver, vitt eller gräddfärgat.

Olösligt i vatten och organiska lösningsmedel.

Olösligt i alkalier och starka mineralsyror.

## PROV

## 1. Förlust vid torkning:

*Mindre än 5 %* under följande betingelser:

2 g PVPP läggs i en kvartsdegel 70 mm i diameter. Torkas i torkskåp vid 100–105 °C i 6 timmar.

Avkyls i en exsickator och vägs.

*OBS!*

Alla gränsvärden nedan avser torrsubstans.

## 2. Aska

Askans vikt mindre än 0,5 % under följande betingelser:

Återstoden från prov 1 inaskas fullständigt vid en maximitemperatur av 500–550 °C och vägs därefter.

## 3. Arsenik

*Mindre än 2 ppm* under följande betingelser:

Förbehandling av provet:

0,5 g PVPP läggs i en rundkolv av borosilikatglas placerad på en skiva med hål i mitten så att halsen hålls snett.

Tillsätt 5 ml ren svavelsyra p. a. och 10 ml ren salpetersyra p. a. och värm upp långsamt. Tillsätt en liten mängd salpetersyra när blandningen börjar bli brun och fortsätt sedan med uppvärmningen. Fortsätt på samma sätt tills vätskan har blivit färglös och kolven fylls av vit ånga från svavelsyran. Låt svalna, tillsätt 10 ml vatten och värm upp på nytt för att avlägsna nitrösa gaser tills vit ånga bildas. Upprepa förfarandet ytterligare två gånger. Efter tredje gången kokas vätskan någon sekund, kyls av och späds med vatten till 40 ml.

*Reagenser p. a.*

## 1. Koncentrerad arseniklösning (100 mg As/l)

Väg noggrant 0,132 g arseniktrioxid som dessförinnan torkats vid 100 °C och överför till en 500 ml E-kolv. Tillsätt 3 ml natriumhydroxid och 20 ml vatten. Skaka tills allt lösts upp. Neutralisera arseniklösningen med 15 ml utspädd svavelsyra 10 % (w/w) och tillsätt mättat bromvatten p. a. tills den gula färgen från fritt brom blir stabil (teoretiskt: 7 ml). Koka upp för att avlägsna överflödigt brom, överför till en 1 000 ml mätkolv och fyll till märket med destillerat vatten.

2. Utspädd arseniklösning (1 mg As/l). Späd 10<sup>4</sup> ml koncentrerad arseniklösning (100 mg/l) med destillerat vatten till 1 000 ml. 1 ml av lösningen innehåller 1/1 000 mg arsenik.

## 3. Blyacetatbomull. Lägg absorberande bomull i 5 % blyacetatlösning (w/v) tillsatt med 1 % ättiksyra. Låt bomullen rinna av och torka i fria luften. Förvara i väl tillsluten flaska.

## 4. Absorberande bomull, torkad vid 100 °C. Förvara i väl tillsluten flaska.

## 5. Papper med kvicksilver(I)-bromid.

Häll en alkoholhaltig lösning av kvicksilver(I)-bromid 5 % i en rektangulär skål. Sänk ner vitt filterpapper, 80 g/m<sup>2</sup>, klippt i bitar om 15 × 22 cm och dubbelvikt, i lösningen. Låt papperet rinna av och torka på mörk plats upphängt på en icke-metallisk lina. Klipp 1 cm från vikningen och 1 cm från nederkanterna. Klipp papperet i 15 × 15 mm fyrkanter och förvara i en väl tillsluten flaska invirad i svart papper.

## 6. Tennkloridlösning. Behandla 20 g kallt tenngranulat p. a. med 100 ml ren saltsyra, d = 1,19. Förvara i närvaro av metalliskt tenn i en lufttät flaska med ventilpropp.

## 7. Kaliumjodidlösning

Kaliumjodid .....	10 g
Vatten .....	ad 100 ml

8. Salpeter syra p. a. för bestämning av arsenik. Syra med en densitet av 1,38 vid 20 °C, innehållande 61,5–65,5 % salpetersyra HNO<sub>3</sub>. Den fasta återstoden får inte överstiga 0,0001 %. Den får inte innehålla bly som kan spåras med ditison och inte heller mer än 1 ppm kloratjoner, 2 ppm sulfatjoner, 2 ppm ortofosfatjoner eller 100 ppm arsenik.9. Svavelsyra p. a. för bestämning av arsenik. Syra med en densitet av 1,831 till 1,835 vid 20 % vol., innehållande minst 95 % svavelsyra H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Den fasta återstoden får inte överstiga 0,0005 %. Den får inte innehålla mer än 2 ppm tungmetaller, 1 ppm järn, 1 ppm kloratjoner, 1 ppm nitratjoner, 5 ppm ammoniumjoner eller 20 ppb arsenik.

## 10. Utspädd svavelsyra 20 % (v/v)

(36 g H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> per 100 ml)

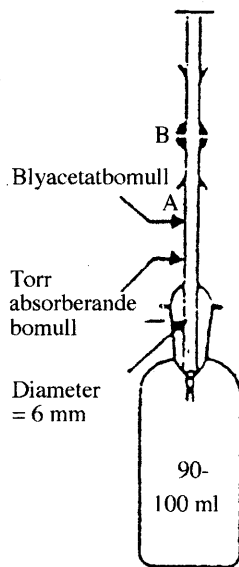
Späd 200 ml ren svavelsyra p. a. med destillerat vatten till 1 000 ml.

## 11. Platinerad zink

Ren zink, arsenikfri, som granulat eller i stänger. Zinken platineras genom att placeras i en bägare och täckas med 1/20 000 platinakloridlösning. Efter två timmar tvättas zinken i destillerat vatten och den platinerade zinken får rinna av på flera lager läskpapper. Torka och förvara i en torr flaska.

Kontrollera att 5 g sådan zink, som placerats i den nedan beskrivna apparaturen tillsammans med 4,5 ml ren svavelsyra, utspädd med vatten till 40 ml, tillsatt med 2 droppar tennklorid och 5 ml kaliumjodidlösning 10 %, inte efterlämnar någon fläck efter minst två timmar på kvicksilver(I)-bromidpapper. Kontrollera också att 1 g arsenik som används på det sätt som anges nedan efterlämnar en tydlig fläck.

## Beskrivning av apparaturen:



Använd en 90–100 ml kolv tillsluten med en glaspropp försedd med ett 90 mm långt glasrör med en innerdiameter av 6 mm. Rørets nedre del är avsmalnande och har ett hål i sidan för att förhindra stötkokning. Den övre kanten har en planslipad yta som är vinkelrät mot rørets längdriktning. Ytterligare ett glasrör med samma innerdiameter och 30 mm långt, som i likhet med det första har en övre kant som är planslipad, kan anslutas till det första glasrøret och fästas med två spiralfjädrar eller gummiringar (se bilden).

## Metod:

Placera en tuss torr absorberande bomull i utlopps-røret vid A och därefter en tuss blyacetatbomull.

Placera en bit kvicksilver(I)-bromidpapper mellan utlopps-rørets två delar vid B och sätt ihop røren.

Häll 40 ml svavelsyra, 2 droppar tenkloridlösning och 5 ml kaliumjodidlösning i kolven. Låt stå i 15 minuter. Tillsätt 5 g platinerad zink och tillslut omedelbart kolven med røret som dessförinnan satts ihop.

Låt reaktionen fortsätta tills den är avslutad (åtminstone 2 timmar). Tag i sär apparaturen, lägg ner kvicksilver(I)-bromidpapperet i 10 ml kaliumjodidlösning i en halvtimme och skaka emellanåt. Skölj noggrant och låt torka.

Den gula eller bruna fläcken skall vara osynlig eller blekare än den fläck som erhålls vid ett parallelltest som utförs med 1 ml arseniklösning, 1 µg/ml, tillsatt med 4,5 ml ren svavelsyra och utspädd med vatten till 40 ml och därefter tillsatt med 2 droppar tenklorid och 5 ml kaliumjodidlösning 10 %.

## 4. Tungmetaller

Uttryckta som bly, mindre än 20 ppm under följande betingelser:

Lös upp askan efter vägning i 1 ml ren saltsyra och 10 ml destillerat vatten. Värm upp den för att påskynda upplösningen. Späd med destillerat vatten till 20 ml. 1 ml av lösningen innehåller mineralämnena från 0,10 g PVPP.

Häll 10 ml av asklösningen i ett 160 × 16 mm provrör tillsammans med 2 ml ren natriumfluoridlösning 4 %, 0,5 ml ammoniumhydroxid, 3 ml vatten, 0,5 ml ren ättiksyra och 2 ml mättat svavelvätevatten.

Fällning får inte ske. Om brun färg uppstår skall den vara svagare än den färg som uppstår i en referenslösning som bereds på följande sätt:

I ett 160 × 16 mm provrör hälls 2 ml lösning som innehåller 0,01 g bly (Pb) i 1 l (10 mg Pb/l), 15 ml vatten, 0,5 ml natriumfluorid 4 % (w/v), 0,5 ml ren ättiksyra och 2 ml mättat svavelvätevatten. Provrøret innehåller 20 g bly.

## OBS!

I den här koncentrationen fälls blyulfid endast ut i ättikssur miljö. En fällning kan framkallas med tillsats av endast 0,05 ml saltsyra per 15 ml, men i praktiken är det svårt att framställa en exakt koncentration.

Om 0,5 ml ättiksyra i stället ersätts med 0,5 ml saltsyra sker endast fällning av koppar, kvicksilver osv.

Eventuellt närvarande järn, normalt som järn (III)-föreningar, oxiderar vätesulfid och framkallar en svavelfällning som döljer den kolloidala blyulfidfällningen. Komplexbundet med 0,5 ml natriumfluorid oxiderar järn vätesulfid i långsammare takt.

Denna mängd räcker för att komplexbinda 1 mg järn (III). Öka mängden natriumfluorid om det finns mer järn närvarande.

Produkter som innehåller kalcium skall filtreras efter tillsats av fluorid.

## 5. Totalt kväve

Mellan 11 och 12,8 % under följande betingelser:

## Apparatur

## A. Apparaturen består av

1. En 1 l kolv A i borosilikatglas för uppvärmning, försedd med en tratt med kran för påfyllning. Den kan värmas med gas eller el.
2. Ett förlängningsstycke C för uppsamling av den vätska som lämnar absorptionskolven B.

3. En 500 ml absorptionskolv B med snedställd hals. Inledningsröret skall nå ner till kolvens nedre del. Avledningsröret är försett med en stänkfångare och utgör den övre delen av absorptionskolven. En tratt försedd med kran leder in den vätska som skall behandlas samt den alkaliska lösningen.
4. En 30 till 40 cm lodrät kylare som avslutas med en kula med spetsig fattning.
5. Ett 250 ml förlag för uppsamling av destillatet.

B. En 300 ml oval destillationskolv med lång hals för mineraliseringen.

#### Nödvändiga substanser

Ren svavelsyra  
 Mineraliseringskatalysator  
 Natriumhydroxid 30 % (w/w)  
 Ren borsyralösning 40 % (w/v)  
 0,1 N saltsyralösning  
 En blandad indikator bestående av bromkresolgrönt och metylrött.

Kolven som används för uppvärmning skall fyllas med vatten som gjorts svagt surt med 1/1 000 svavelsyra. Före varje analys skall vätskan kokas med avluftningsventilen P öppen för att avlägsna CO<sub>2</sub>.

#### Metod

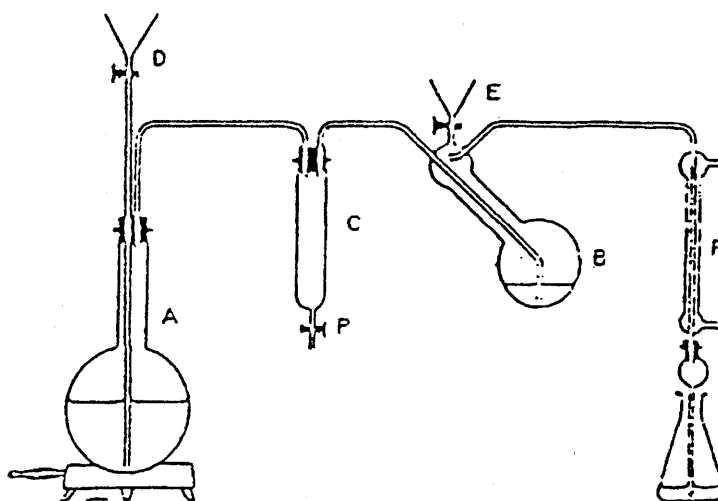
Väg noggrant upp ca 0,20 g PVPP och överför till destillationskolven. Tillsätt 2 g katalysator och 15 ml ren svavelsyra.

Värm över öppen låga och håll kolvens hals lutande tills lösningen är färglös och kolvens sidor är fria från inaskade ämnen.

Späd med 50 ml vatten efter nedkylning och fortsätt sedan nedkylningen. För över vätskan till absorptionskolven B med hjälp av filtret E. Tillsätt därefter 40–50 ml natriumhydroxid 30 % för att framkalla en basisk reaktion och vattenångdestillera den ammoniak som bildas genom att samla upp destillatet i 5 ml borsyralösning som dessförinnan hållits i förlaget tillsammans med 10 ml vatten, med rörets kulformiga avslutning nedsänkt i vätskan. Tillsätt 1 eller 2 droppar blandad indikator och samla upp 70–100 ml destillat. Titra destillatet med 0,1 N saltsyralösning tills indikatorn slår om till rosa-violett.

1 ml 0,1 N saltsyralösning motsvarar 1,4 mg kväve.

Apparatur för vattenångdestillation av ammoniak  
 (enligt Parnas och Wagner)



Kranarna P och E kan ersättas med en plastförbindelse med Mohrklämma.

## 6. Löslighet i vattenhaltig miljö

Mindre än 0,5 % under följande betingelser:

Placera 10 g PVPP i en 200 ml kolv som innehåller 100 ml destillerat vatten. Skaka om och låt stå i 24 timmar. Filtrera på ett ytfiler med en porvidd av 2,5 µ och därefter på ett ytfiler med en porvidd på 0,8 µ. Den rest som återstår när filtratet indunstas till torrhet över vattenbad skall väga mindre än 50 mg.

## 7. Löslighet i sur alkoholhaltig miljö

Mindre än 1 % under följande betingelser:

Placera 1 g PVPP i en kolv som innehåller 500 ml av följande blandning:

Ättiksyra .....	3 g
Etanol .....	10 ml
Vatten.....	ad 100 ml

Låt stå i 24 timmar. Filtrera på ett ytfiler med en porvidd på 2,5 µ och därefter på ett ytfiler med en porvidd på 0,8 µ. Koncentrera filtratet över vattenbad. Avsluta indunstningen över vattenbad i en tared kvartsdegel, 70 mm i diameter. Den torra rest som återstår efter indunstningen skall väga mindre än 10 mg, med hänsyn tagen till eventuell rest från indunstningen av ättiksyraetanolblandningen på 500 ml.

## 8. Effektiviteten hos PVPP i förhållande till adsorption av fenolföreningar

Den aktivitetsnivå som konstateras under följande betingelser skall vara minst 30 %.

### A. Reagenser

- 0,1 N natriumhydroxidlösning.
- 0,1 N salicylsyralösning.  
(13,81 g salicylsyra löses i 500 ml metanol och späds till 1 l vatten.)

### B. Metod

- Väg 2 — 3 g PVPP i en 250 ml E-kolv och notera vikten, W, med en noggrannhet av 0,001 g.
- Beräkna provets torrsubstans och notera innehållet i procent, P, med en noggrannhet av 1 decimal.
- Tillsätt 0,1 N salicylsyralösning enligt följande formel:  
 $43 \times W \times P = \text{antal ml som skall tillsättas.}$
- Tillslut kolven och skaka om under fem minuter.
- Häll blandningen vid 25° C i en büchnertratt med filter, ansluten till en 250 ml kolv. Vänta tills den tömtes och det finns tillräckligt med filtrat för att ta ut ett 50 ml prov (filtratet måste vara klart).
- Pipettera 50 ml av filtratet i en 250 ml E-kolv.
- Bestäm neutralisationspunkten med fenolftalein och 0,1 N natriumhydroxidlösning och notera volymen  $V_s$ .
- Titra på samma sätt 50 ml salicylsyra som referenslösning och notera volymen  $V_b$ .
- Beräkning av aktiviteten i %:

$$\frac{V_b - V_s}{V_b} \times 100$$

OBS! Alla gränsvärden i punkterna 2–8 avser torrsubstans.

## 9. Fri N-vinylpyrrolidon — högst 0,1 %.

### Metod

Slamma upp 4,0 g av provet i 30 ml vatten, rör om under 15 minuter, överför till en 250 ml E-kolv genom att hålla provet genom ett glasfilter med en porvidd av 9–15 µm (= typ G4). Tvätta återstoden med 100 ml vatten, tillsätt 500 mg natriumacetat till filtraten och titra med 0,1 N jod tills jodfärgen står kvar. Tillsätt ytterligare 3,0 ml 0,1 N jod, låt stå i 10 minuter och titra överflödigt jod med 0,1 N natriumtiosulfat, tillsatt med 3 ml löslig stärkelse innan blandningen börjar skifta färg. Utför ett blankprov. Det åtgår endast 0,72 ml jod, vilket motsvarar högst 0,1 % vinylpyrrolidon.

## 10. Fri N,N-divinylimidazol — högst 2 mg/kg

*Princip*

Bestämning med hjälp av gaskromatografi på kapillärkolonn av fri N,N-divinylimidazolidin extraherat från olöslig PVP med ett lösningsmedel (acetone).

*Internstandard*

Lös upp 100 mg heptansyranitril (önantsyranitril), vägt med en noggrannhet av 0,1 mg, i 500 ml acetone.

*Beredning av provet*

Väg ca 2–2,5 g polymer med en noggrannhet av 0,2 mg i en 50 ml E-kolv. Tillsätt 5 ml internstandard med pipett och därefter ca 20 ml acetone. Skaka blandningen under fyra timmar eller låt den stabilisera sig i minst 15 timmar. Analysera lösningen ovanpå fällningen med hjälp av gaskromatografi.

*Kalibreringslösning*

Väg ca 25 mg N,N-divinylimidazolidin med en noggrannhet av 0,2 mg i en kolv och fyll med acetone till 100 ml. Överför 2 ml av lösningen med pipett till en annan 50 ml kalibreringskolv och fyll med acetone till 50 ml. Överför 2 ml av denna lösning till en annan kolv, tillsätt 5 ml internstandard (se ovan) och fyll med acetone till 25 ml.

*Betingelser för gaskromatografi*

- Kolonn: "DB-Wax" (smält kvarts) kapillär (tvärbundet Carbowax - 20 ml), längd 30 mm, innerdiameter 0,25 mm, skiktjocklek 0,5 µm.
- Programmerad temperaturskala: 140 till 240 °C, 4 °C per minut.
- Injektor: Splitinjektor, 220 °C.  
Splitutflöde 30 ml.
- Detektor: Termoelektronisk detektor (optimerad enligt tillverkarens instruktioner), 250 °C.
- Bärargas: Helium, 1 bar (övertryck).
- Insprutad mängd: 1 µl av lösningen ovanför provlösningens fällning eller av kalibreringslösningen.

*Metod:*

Tillförlitlig bestämning av kalibreringsfaktorn för specifika analysförhållanden med hjälp av upprepade insprutningar av kalibreringslösning. Analysera provet. Innehållet av N,N-divinylimidazolidin i olöslig PVP får inte överstiga 0,1 %.

*Beräkning av kalibreringsfaktorn:*

$$f = \frac{W_D \times A_{St}}{W_{St} \times A_D}$$

$W_D$  = använd mängd N,N-divinylimidazolidin (mg)

$W_{St}$  = mängd internstandard (mg)

$A_{St}$  = topparea för internstandard

$A_D$  = topparea för N,N-divinylimidazolidin

*Beräkning av innehållet av N,N-divinylimidazolidin*

$$C_D = \frac{1000 \times f \times A_D \times W_{St}}{A_{St} \times W_S} \quad (\text{mg/kg})$$

$C_D$  = koncentration av N,N-divinylimidazolidin (mg/kg)

$F$  = kalibreringsfaktor

$A_D$  = topparea för N,N-divinylimidazolidin

$W_{St}$  = mängd internstandard som tillsatts provet (mg)

$A_{St}$  = topparea för internstandard

$W_S$  = använd provmängd (g)

**BILAGA 2****MJÖLKSRYRABAKTERIER****Specifikationer**

Mjölksyrabakterier, vars användning regleras i bilaga 6.1 q och 6.3 z till förordning (EEG) nr 822/87, skall tillhöra släktena *Leuconostoc*, *Lactobacillus* och/eller *Pedococcus*. De skall ha förmågan att omvandla äppelsyra i druvmust eller vin till mjölksyra utan att smaken påverkas.

De skall ha hållits åtskilda från druvor, druvmust, vin eller produkter som framställts av druvor. Namnet på släktet och arten samt uppgift om stammen skall framgå av etiketten, tillsammans med uppgift om ursprung och stamodlaren.

Särskilt tillstånd krävs för att få utföra gentekniska experiment med mjölksyrabakterier.

**Tillstånd**

De skall användas i flytande eller fryst tillstånd eller som frystorkat pulver, i renkultur eller blandkultur.

**Immobiliserade bakterier**

Substratet för framställning av immobiliserade mjölksyrabakterier skall vara inert och tillåtet för användning vid vinframställning.

**Kontrollformer**

— Kemisk kontroll:

Samma krav för de undersökta ämnena som för andra enologiska preparat, särskilt vad gäller tungmetaller.

— Mikrobiologisk kontroll:

— Halten av förökningsdugliga mjölksyrabakterier skall vara minst  $10^8$ /g eller  $10^7$ /ml.

— Halten av mjölksyrabakterier av en annan art än de angivna stammarna skall vara lägre än 0,01 % av den totala mängden förökningsdugliga mjölksyrabakterier.

— Halten av aeroba bakterier skall vara lägre än  $10^3$  per gram pulver eller per ml.

— Det totala jästinnehållet skall vara lägre än  $10^3$  per gram pulver eller per ml.

— Mögelinnehållet skall vara lägre än  $10^3$  per gram pulver eller per ml.

**Tillsatser**

Tillsatser som används vid beredning av mjölksyrabakteriekulturer eller vid reaktivering av mjölksyrabakterier skall vara substanser som är tillåtna för användning i livsmedel och skall uppges på etiketten.

**Framställningsdatum**

Tillverkaren skall uppges datum då varan lämnade fabriken.

**Användning**

Tillverkaren skall lämna en bruksanvisning eller ange reaktiveringsmetod.

**Konservering**

Förvaringssättet skall framgå tydligt av etiketten.



## Analysmetoder

- Mjölksyrabakterier: substrat A<sup>(1)</sup>, B<sup>(2)</sup> eller C<sup>(3)</sup> med den användningsmetod för stammen som angivits av tillverkaren.
- Aeroba bakterier: Bacto-Agar-substrat.
- Jäst: Malt-Wickerham-substrat.
- Mögel: Malt-Wickerham eller Czapeck-substrat.

( <sup>1</sup> ) Jästextrakt .....	5	g
Köttextrakt .....	10	g
Tryptisk pepton .....	15	g
Natriumacetat .....	5	g
Ammoniumcitrat .....	2	g
Tween 80 .....	1	ml
Mangansulfat .....	0,050	g
Magnesiumsulfat .....	0,200	g
Glukos .....	20	g
Vatten .....	ad 1 000	ml
pH .....	5,4	
( <sup>2</sup> ) Tomatsaft .....	250	ml
Jästextrakt Difco .....	5	g
Pepton .....	5	g
L-äppelsyra .....	3	g
Tween 80 .....	1 droppe	
Magnesiumsulfat .....	0,050	g
Mangansulfat .....	0,050	g
Vatten .....	ad 1 000	ml
pH .....	4,8	
( <sup>3</sup> ) Glukos .....	5	g
Trypton Difco .....	2	g
Pepton Difco .....	5	g
Leverextrakt .....	1	g
Tween 80 .....	0,05	g
Tomatsaft, utspädd 4,2 ggr filtrerad på Whatman nr 1 .....	1 000	ml
pH med PO <sub>4</sub> H <sub>3</sub> n eller KOH .....	5,5	
Glukos .....	20	g