



Bundesamt für
Verbraucherschutz und
Lebensmittelsicherheit

Zweite Stellungnahme bezüglich der Möglichkeiten und Grenzen der Hochdurchsatz-DNA-Sequenzierung (NGS) zur Detektion von Lebensmittelverfälschungen bei Honig

Arbeitsgruppe § 64 LFGB „NGS-Speziesidentifizierung“



IMPRESSUM

Das Werk ist urheberrechtlich geschützt. Die dadurch begründeten Rechte, insbesondere die der Übersetzung, des Nachdrucks, des Vortrags, der Entnahme von Abbildungen und Tabellen, der Funksendung, der Mikroverfilmung, der Wiedergabe auf fotomechanischem oder ähnlichem Weg und der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen bleiben, auch bei nur auszugsweiser Verwertung, vorbehalten. Eine Vervielfältigung dieses Werkes oder von Teilen dieses Werkes ist auch im Einzelfall nur in den Grenzen der gesetzlichen Bestimmungen des Urheberrechtsgesetzes in der jeweils geltenden Fassung zulässig. Sie ist grundsätzlich vergütungspflichtig. Zuwiderhandlungen unterliegen den Strafbestimmungen des Urheberrechts.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

© 2026 Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL)

Herausgeber:

Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL)

Bundesallee 51

38116 Braunschweig

Redaktionsgruppe:

§ 64 LFGB AG „NGS-Speziesidentifizierung“

ViSdP: Harald Händel (BVL, Pressesprecher)

Titelbild: © KI generiert mit Canva.com

Zusammenfassung

In dieser zweiten Stellungnahme der Arbeitsgruppe § 64 LFGB „NGS-Speziesidentifizierung“ werden die aktuellen Erkenntnisse zur Eignung der Next Generation-Sequencing (NGS)-Analytik, insbesondere der Methoden *Metabarcoding* und *Metagenomics*, zur Überprüfung der Authentizität von Honig zusammengefasst.

Die Verfälschung von Honig ist ein präsent Thema in den Medien, bei dem die NGS-Analytik als neue Schlüsseltechnologie zur Überprüfung der Authentizität dargestellt wird. Aufgrund des anhaltenden Interesses an diesem Thema hat sich im letzten Jahr eine Projektgruppe „NGS-Honig“ im Rahmen der §64 LFGB AG „NGS-Speziesidentifizierung“ gebildet. In der Projektgruppe wurden unter anderem DNA-Extraktionsverfahren aus Honig etabliert sowie *Metabarcoding*- und *Metagenomics*-Analysen von Honig im Vergleich zur mikroskopischen Pollenanalyse und ^1H -NMR (Protonen-Kernspinresonanzspektroskopie) durchgeführt. Darüber hinaus wurde eine Laborvergleichsanalyse von Honigen und mit Zuckersirup versetzten Honigen vorgenommen. Dabei wurden folgende Erkenntnisse gewonnen:

1. DNA-Extraktion:

Es wurden Methoden zur DNA-Extraktion aus Honig mit und ohne vorherige Anreicherung und Aufschluss von Pollen etabliert. Für vergleichbare Analysen ist eine Standardisierung der Extraktionsmethode essenziell.

2. Nachweis des Zusatzes von Zuckersirup:

Die Untersuchungen ergaben, dass die NGS-Verfahren *Metabarcoding* und *Metagenomics* nicht geeignet sind, einen Zusatz von Zuckersirup eindeutig nachzuweisen. Dies liegt daran, dass die verwendeten Sirupe oft keine oder nur sehr wenig DNA enthalten, sodass sich das DNA-Profil des Honigs durch den Zusatz kaum verändert. Die DNA-Konzentration allein ist kein zuverlässiger Indikator für eine Streckung.

3. Analytische Herausforderung zur Artenidentifizierung (insbesondere von Pflanzen):

Metagenomics liefert einen breiten Überblick über alle DNA-Komponenten (Pflanzen, Tiere, Insekten (Bienen), Viren, Bakterien etc.), ist aber aufgrund der begrenzten Anzahl von Referenzgenomen (~2000 Pflanzen) in der Auflösung limitiert und kann z.B. aufgrund von fehlerhaften Referenzgenom-Sequenzanteilen falsch-positive Ergebnisse liefern. *Metabarcoding* ist derzeit für die Pflanzenbestimmung überlegen, da mehr artenspezifische Barcodes verfügbar sind. Das Ergebnis ist jedoch von der Wahl der Barcode-Primer abhängig. ITS2 (Internal Transcribed Spacer 2) ist eine weit verbreitete Barcode-Region für Pflanzen, hat jedoch Nachteile wie eine nicht vollständige taxonomische Auflösung, eine variable Länge, eine unvollständige Datenbankabdeckung und Verzerrungen bei der Häufigkeitsabschätzung. Falsch-negative Ergebnisse können zudem auftreten, wenn DNA aus bestimmten Pollen nicht extrahiert oder DNA nicht amplifiziert werden kann.

4. Botanische Zusammensetzung (Pflanzenartidentifizierung) als Indiz für die geografische Herkunft:

NGS ist grundsätzlich geeignet, die botanische Zusammensetzung zu bestimmen und damit Hinweise auf die geografische Herkunft zu liefern. Allerdings fehlen bislang harmonisierte analytische Kriterien für die standardisierte Beurteilung von Sortenhonigen und deren Herkunft mittels NGS. Die mikroskopische Pollenanalyse (Melissopalynologie) ist nach wie vor die standardisierte und rechtlich etablierte Methode. Wie bei der mikroskopischen Pollenanalyse müssten NGS-Ergebnisse außerdem mit organoleptischen und chemisch-physikalischen Parametern kombiniert werden.

5. Technische Grenzen:

NGS-Daten sind kompositionell – sie zeigen relative Häufigkeiten, nicht absolute Mengen. Daher kann insbesondere beim *Metabarcoding* aus ihnen nicht direkt auf absolute Anteile oder Mengenangaben geschlossen werden (Verdrängungseffekt). Wenn eine Art hinzugefügt oder entfernt wird, verändern sich die relativen Anteile aller anderen Arten, auch wenn die jeweiligen absoluten Mengen gleichbleiben. Dies erschwert die Interpretation und den Vergleich von Proben erheblich und macht Aussagen über absolute Mengen unmöglich.

6. Abgrenzung zum genetischen Fingerabdruck:

Ein DNA-Honig-Profil darf weder semantisch noch methodisch mit dem in der Forensik etablierten genetischen Fingerabdruck gleichgesetzt werden. Letzterer basiert auf ermittelten Allellängen hochvariabler Genom-Loci, die in der DNA eines Individuums genetisch verankert ist und lebenslang unverändert bleibt. Die DNA in einem Honig ist hingegen eine Momentaufnahme aus externen Quellen unterschiedlichster Lebensformen. Die Bewertung zur Übereinstimmung beziehungsweise Abgrenzung von Honig-DNA-Profilen von Proben zu Profilen in einer Vergleichsdatenbank ist unklar, da Honig-Profile aus Datenbanken in den seltensten Fällen mit Proben übereinstimmen dürften und bei Mischungen ebenfalls zu unterschiedlichen Profilen führen.

7. Akkreditierung nach DIN EN ISO/IEC 17025:

Die Akkreditierung nach DIN EN ISO/IEC 17025 bestätigt die technische Kompetenz und allgemeine Anforderungen, dass alle Prüfungen und Kalibrierungen mit validierten Methoden und unter kontrollierten Bedingungen durchgeführt werden. Dies ersetzt jedoch nicht den wissenschaftlichen Nachweis, dass eine Methode für genau die betrachtete Fragestellung (z. B. Zuckersirupnachweis in Honig) robust, spezifisch und auf andere Labore übertragbar ist.

8. Fazit:

NGS hat ein erhebliches Potenzial für spezifische Fragestellungen der Authentizitätsprüfung, insbesondere bei der Überprüfung der botanischen Zusammensetzung und der geografischen Herkunft von Honigen. Diese Analytik ist jedoch nicht geeignet, um den Zusatz von Zuckersirup nachzuweisen. Je nachdem welcher Sirup eingesetzt wird, sind für einen solchen Nachweis aber bereits verschiedene analytische Methoden verfügbar beziehungsweise in der Entwicklung. Neben der bereits erwähnten ^1H -NMR zählen hierzu unter anderem (Stabilisotopen-)massenspektrometrische Verfahren. Aufgrund ihrer kompositionellen Natur sind insbesondere *Metabarcoding*-Verfahren in der Aussagekraft quantitativer Vergleiche limitiert. NGS-Verfahren könnten jedoch Indizien für Verfälschungen liefern. Wir empfehlen derzeit, diese Verfahren zusammen mit standardisierten Verfahren wie der mikroskopischen Pollenanalyse einzusetzen. Für den routinemäßigen Einsatz sind eine Standardisierung der DNA-Extraktion und der Barcode-Primerwahl (beim *Metabarcoding*), systematische Erweiterungen von Referenzdatenbanken, Validierungen durch Ringversuche und Laborvergleichsstudien sowie die Etablierung harmonisierter analytischer Kriterien und Grenzwerte für die standardisierte Beurteilung der Ergebnisse notwendig.

Inhaltsverzeichnis

1	Ziel der Stellungnahme	6
2	Hintergrund und aktuelle Relevanz des Themas	6
3	DNA-Extraktion aus Honig.....	7
4	Nachweis von Zuckersirup-Zusatz	8
6	Botanische Zusammensetzung als Indiz für die geografische Herkunft	10
7	Limitationen der Vergleichbarkeit von <i>Metabarcoding</i> - und <i>Metagenomics</i> -Daten .	11
8	Abgrenzung zum genetischen Fingerabdruck.....	12
9	Akkreditierung nach DIN EN ISO/IEC 17025	12
10	Fazit.....	12

1 Ziel der Stellungnahme

Das Ziel dieser zweiten Stellungnahme ist eine Zusammenfassung der aktuellen Erkenntnisse zur Bewertung der Eignung von NGS-Analytik für die Überprüfung der Authentizität.

Mitarbeitende der Stellungnahme waren Katja Bohm (Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES)), Dr. Stefanie Dobrovolny (Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit (AGES)), Dr. Ilka Haase (Nationales Referenzzentrum für authentische Lebensmittel (NRZ-Authent)), Prof. Dr. Thomas Hankeln (Johannes Gutenberg Universität Mainz), Dr. Rupert Hochegger (AGES), Dr. Ingrid Huber (Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL)), Dr. Regina Klapper (NRZ-Authent), Dr. Klaus Pietsch (Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Freiburg (CVUA-FR)), Mirjam Schmidt (LAVES), Dr. Kathrin Szabo (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL)), Dr. Anne Wöhlke (LAVES), Tobias Warmann (LAVES) (Autorinnen und Autoren alphabetisch sortiert).

2 Hintergrund und aktuelle Relevanz des Themas

Die Authentizität von Honig steht in den letzten Jahren zunehmend im Fokus der Lebensmittelanalytik. Honig gilt weltweit als eines der häufigsten verfälschten Lebensmittel, da er zu einem großen Teil aus Glukose und Fruktose besteht und daher relativ leicht durch Zuckersirupe oder andere Zusätze gestreckt werden kann. Auch die Angabe falscher Sorten oder Herkünfte ist ein bekanntes Problem.

Im Rahmen der von der Europäischen Kommission koordinierten Maßnahme „From the Hives“ wurden bereits 2021/2022 Honigproben an EU-Grenzen gezogen und mit verschiedenen Analysemethoden (EA/LC-IRMS, HPAEC-PAD, ¹H-NMR, kein DNA-basiertes Verfahren) untersucht. Von 320 Proben wurden 46 % als verdächtig bezüglich eines Zusatzes von Zuckersirup bewertet. Im Rahmen eines vorangegangenen EU-weit koordinierten Kontrollplans (2015-2017) waren dagegen nur 14 % der analysierten Honigproben als auffällig bewertet worden. Die Zunahme dieser abweichenden Proben wurde von den Autoren damit begründet, dass neuere Methoden mit verbesserter Nachweisfähigkeit verwendet wurden¹. In Medienberichten aus dem Jahr 2024 ließen der Deutsche Berufs- und Erwerbsimkerbund (DBIB) und die European Professional Beekeeper Association (EPBA) Honigproben aus deutschen Supermärkten von dem estnischen Analytiklabor Celvia CC AS (Tartu) mittels der NGS-Methode *Metagenomics* untersuchen. Dabei wurden 80 % der Proben als nicht authentisch beurteilt^{2,3}. Für die ZDF-Sendung „frontal“ (Ausstrahlung am 17.12.2024) wurden weitere Honige aus deutschen Supermärkten von Celvia CC AS (mit *Metagenomics*) sowie von dem österreichischen Analytiklabor Sinsoma GmbH (mit *Metabarcoding in Kombination mit quantitativer real-time PCR (qPCR)*) untersucht, wobei von ähnlichen Ergebnissen berichtet wurde⁴. Aufgrund der kontrovers diskutierten Leistungsfähigkeit der erstmals für die Honig-Authentifizierung eingesetzten NGS-Methoden entschied die § 64 LFGB Arbeitsgruppe „NGS-Speziesidentifizierung“, eine Stellungnahme zur Beurteilung der Möglichkeiten und Grenzen der *Metabarcoding*- und *Metagenomics*-Methoden hinsichtlich der Aufdeckung möglicher Verfälschungen bei Honig zu verfassen⁵. Weiterhin forderten der DBIB und EPBA die DNA-Analytik als neues Verfahren in das bestehende Methodenangebot zu integrieren, um „Lücken bei der Aufdeckung“ zu schließen^{6,7}. Ein weiterer ZDF „frontal“-Bericht zum Thema Honigverfälschung deckte den Verkauf von Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)-Test-

¹ Ždiniaková et al. (2023) EU Coordinated action to deter certain fraudulent practices in the honey sector - Results of analytical testing of imported honey. Publications Office of the European Union, Luxembourg. JRC130227. <https://doi.org/10.2760/184511>

² <https://berufsimker.de/schock-nach-dna-test-80-prozent-beprobter-honige-gefaelscht>

³ <https://www.youtube.com/watch?v=2fNb0NNrJRI>

⁴ <https://www.zdf.de/nachrichten/wissen/honig-supermarkt-gepanscht-dna-analyse-100.html>, 17.12.2024

⁵ Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL). Stellungnahme zu den Möglichkeiten und Grenzen der Hochdurchsatz-DNA-Sequenzierung (NGS) zum Nachweis von Lebensmittelbetrug bei Honig, 2025.

https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/07_Untersuchungen/Stellungnahme_Hochdurchsatz-DNA-Sequenzierung-Honig_kurz.html

⁶ ernährung aktuell-Der Lebensmittelbrief 6/2025 „Durchbruch gegen Honigbetrug- Wie Imkerverbände und Politik den Markt für echten Honig neu ordnen“, <https://www.honigretten.de/durchbruch-gegen-honigbetrug-wie-imkerverbaende-und-politik-den-markt-fuer-echten-honig-neu-ordnen/>

⁷ <https://professionalbeekeepers.eu/ueber-den-dna-test/>

sicherem Sirup bei chinesischen Sirup-Herstellern auf (Ausstrahlung am 05.08.2025)⁸. Das Thema DNA-Analytik wurde in dieser Sendung allerdings nicht angesprochen.

Aufgrund des anhaltenden Interesses hat sich im letzten Jahr eine Projektgruppe „NGS-Honig“ im Rahmen der § 64 LFGB Arbeitsgruppe „NGS-Speziesidentifizierung“ gebildet. In der Projektgruppe werden regelmäßig neue Erkenntnisse zur Authentizitätsprüfung von Honig mittels DNA-Analytik ausgetauscht. Dabei wurden folgende Analysen durchgeführt:

- Etablierung von DNA-Extraktionsverfahren mit und ohne Pollenanreicherung und -aufschluss aus Honig.
- *Metabarcoding*- und *Metagenomics*-Analysen von Honig: Es wurden Vorversuche an verschiedenen Honigsorten (Imker- und Großhandelshonig) durchgeführt. Beim *Metabarcoding* wurden zunächst nur Genmarker für die Pflanzen-Identifikation eingesetzt. Die erhaltenen Daten wurden mit den Ergebnissen weiterer Analysemethoden wie mikroskopische Pollenanalyse (Melissopalynologie; qualitativ und quantitativ) und ¹H-NMR (Protonen-Kernspinresonanzspektroskopie) verglichen.
- *Metabarcoding*- und *Metagenomics*-Analysen von Honigen mit Zuckersirupzusatz: Um zu testen, ob Zusätze von Zuckersirup mittels DNA-Analytik erkannt werden können, wurde eine Vergleichsuntersuchung mit vier *Metabarcoding*-Laboren und einem *Metagenomics*-Labor durchgeführt. Die teilnehmenden Labore erhielten dabei fünf Blindproben. Diese Proben beinhalteten einen reinen Sirup aus Maisstärke, zwei Rohhonige sowie diese Rohhonige einmal mit 40 % und einmal mit 10 % Sirup versetzt. Die Proben wurden sowohl als Honige, als auch in Form extrahierter DNA an die teilnehmenden Labore versendet.

Aus den Ergebnissen der Untersuchungen der Projektgruppe können die im Folgenden aufgezeigten Erkenntnisse gezogen werden.

3 DNA-Extraktion aus Honig

Eine DNA-Extraktionsmethode mit und ohne Anreicherung und Aufschluss von Pollen wurde etabliert. Bei der DNA-Extraktion ohne Anreicherung und Pollenaufschluss wurde der Honig mit einem Lysepuffer und Enzymen versetzt und die DNA mittels kommerzieller automatisierter Kit-Verfahren über paramagnetische Partikel extrahiert. Für die DNA-Extraktion aus den Pollen wurden die im Honig enthaltenen Pollen zunächst angereichert, gequollen und aufgebrochen und analog mit Lysepuffer und Enzymen versetzt; anschließend erfolgte die DNA-Extraktion ebenfalls anhand des oben beschriebenen kommerziellen Kit-Verfahrens. Das Extraktionsverfahren mit den beiden Probevorbereitungsarten wurden vergleichend für die nachfolgenden Untersuchungen eingesetzt. Basierend auf den Ergebnissen wird zukünftig ein Standardprotokoll für die DNA-Extraktion festgelegt.

Metagenomics-Versuche mit aus Honig extrahierter DNA mit bzw. ohne Pollenanreicherung ergab für die Pollen-angereicherte DNA erwartungsgemäß eine Anreicherung von ca. 30-50% mehr Pflanzenspezies. Pollen-angereicherte DNA wies zudem bis zu 4-fach mehr Bienen-, Pilz- und Bakterien-DNA auf, wohingegen DNA menschlichen Ursprungs sowie von Bienen-assoziierten Viren abgereichert waren. Weiterhin wurden Daten von *Metagenomics*-sequenzierten Honigen anderer Institutionen aus öffentlichen Datenbanken heruntergeladen und statistisch mittels Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analysis, PCA) analysiert. Dabei wurden Hinweise auf technische Artefakte beobachtet, die möglicherweise auf eine Labor-spezifische DNA-Extraktionsmethode zurückzuführen sind.

Der Vergleich von *Metabarcoding*-Ergebnissen von aus Honig extrahierter DNA mit bzw. ohne Pollenanreicherung zeigte keine signifikanten Unterschiede für die Hauptkomponenten an Pflanzenarten in den Vergleichshonigen. Die Pollenanreicherung führte erwartungsgemäß tendenziell zu einer größeren Anzahl an detektierbaren Pflanzenarten.

⁸ <https://www.zdfheute.de/wirtschaft/fake-honig-supermarkt-labor-test-sirup-china-100.html>, 05.08.2025

Grundsätzlich zeigte sich sowohl bei der Laborvergleichsstudie (siehe 4) als auch bei weiteren Analysen, dass die DNA-Extraktion bei den Proben zu unterschiedlichen DNA-Ausbeuten/-Konzentrationen führte. Dies kann verschiedene Ursachen haben und ist auch bei anderen Lebensmittelmatrizes bekannt. Daher ist die DNA-Konzentration einer Probe kein messbares Indiz für eine Streckung mit Sirup. Die Annahme, dass DNA-Gehalte in mit Zuckersirup versetzten Honigen signifikant geringer sein müssten, sollte somit verworfen werden.

Fazit: Um die Vergleichbarkeit von NGS-Analyseergebnissen zu gewährleisten, ist eine Standardisierung der DNA-Extraktionsmethode wichtig.

4 Nachweis von Zuckersirup-Zusatz

Im Rahmen der Laborvergleichsstudie wurden Honig, Sirup und mit Sirup versetzter Honig mittels *Metagenomics* und *Metabarcoding* analysiert. Bei *Metagenomics* ergaben die Honige und ihre korrespondierenden, mit Sirup versetzten Proben nahezu identische Profile für Pflanzen und andere Taxa, während der reine Sirup selbst um Größenordnungen weniger DNA enthielt, dementsprechend viel weniger Sequenzen lieferte und in seinem Profil den mitgeführten Leer-Kontrollen (ohne Honig bzw. Sirup) entsprach. Auch beim *Metabarcoding* konnten die Labore die Honige und ihre korrespondierenden, mit Sirup versetzten Analoga mehrheitlich einander zuordnen. Weder durch *Metagenomics* noch durch *Metabarcoding* konnte jedoch eindeutig bestimmt werden, welche Probe den Honig bzw. den mit Sirup versetzten Honig enthielt.

Dass der Zusatz von Sirup in der Laborvergleichsstudie zu keinen eindeutigen Unterschieden in den DNA-Profilen führte, lässt sich damit begründen, dass die Sirupe je nach Herstellungsprozess keine oder kaum DNA enthalten^{9,10}. In Bezug auf die Diversität der in einer Honigprobe detektierten Arten ist eine geringe Speziesdiversität also nicht gleichzusetzen mit der Annahme, dass Sirup hinzugesetzt wurde. Die in der Laborvergleichsstudie und bei weiteren Tests analysierten Sirupe enthalten offensichtlich so wenig DNA, dass ihr Nachweis nativ oder im Honig gemischt per DNA-Analyse nicht möglich ist.

Die Proben der Laborvergleichsstudie wurden von der Projektgruppe ebenfalls mittels ¹H-NMR untersucht. Zusammengehörige Honige sowie die jeweilige verfälschte Probe konnten dabei zweifelsfrei identifiziert werden. Zudem wurde der Sirupanteil in den verfälschten Honigen korrekt abgeschätzt. In der Praxis ist ein so eindeutiges Ergebnis allerdings nicht möglich. Im vorliegenden Versuchsaufbau war die detaillierte Auswertung dank der Kenntnis der eingesetzten reinen Honige und des Sirups berechenbar und ist daher nur eingeschränkt auf die Prüfung von Handelsproben übertragbar.

Mittels mikroskopischer Pollenanalyse konnten die zusammengehörigen Honige sowie die jeweilige verfälschte Probe ebenfalls zugeordnet werden. Darüber hinaus konnte aufgrund des niedrigeren absoluten Pollengehaltes die mit Zuckersirup versetzte Proben richtig identifiziert werden, jedoch nur, da die eingesetzten Honige und damit die authentischen Pollengehalte bekannt waren.

5 Analytische Herausforderungen bei der Artenidentifizierung in Honigen

Die Laborvergleichsproben (siehe 4) sowie zusätzliche Honige von Imkern und aus dem Großhandel wurden parallel mittels *Metagenomics*, *Metabarcoding* und mikroskopischer Pollenanalyse untersucht. Dabei zeigten sich methodisch bedingte Unterschiede, die im Wesentlichen von der verwendeten DNA-Extraktionsmethode, der Primer-Auswahl beim *Metabarcoding* sowie der Qualität der Sequenzdatenbanken bei der bioinformatischen Auswertung abhängig waren.

⁹ Dodd et al. (2025). Detection of sugar syrup adulteration in UK honey using DNA barcoding. *Food Control*, 167, 110772.

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2024.110772>

¹⁰ Oguchi et al. (2009). Investigation of Residual DNAs in Sugar from Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.). *Food Hygiene and Safety Science/Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 50(1), 41-46. <https://doi.org/10.3358/shokueishi.50.41>

Weitere folgende Spezifika stellten sich bei der Anwendung der Methoden heraus:

Metagenomics

- Die *Metagenomics*-Methode liefert als ungezielter, PCR-freier Screening-Ansatz einen breiten Überblick über alle DNA-Komponenten in Honig. Sie gibt nicht nur Auskunft über Pflanzenarten, sondern auch über die Honigbiene selbst, andere Insekten, Bienen-relevante Schädlinge, Bienen-assoziierte Viren sowie Bakterien und Pilze. Bienen-DNA, virale Komponenten und auch humane DNA-Anteile der Proben liefern dabei zusätzliche populationsgenetische Informationen, die für eine Herkunftsbeurteilung von Honig zukünftig nützlich sein können.
- Im Sinne einer rein pflanzenbasierten Analytik, z. B. zur Bestimmung der botanischen Zusammensetzung oder geografischen Herkunft, zeigte *Metagenomics* eine unproblematische und gut nachvollziehbare Identifizierung von dominierenden Komponenten wie z.B. Raps in Rapshonig. Aufgrund der derzeit nur etwa 2000 verfügbaren Genomsequenzen von Pflanzenarten ist die Auflösung der Methodik allerdings noch limitiert. Dies begrenzt derzeit auch einen Vergleich von Taxon-Listen, die mit verschiedenen Analysemethoden (*Metagenomics*, *Metabarcoding*, mikroskopische Pollenanalyse) erstellt wurden.
- Es wurden falsch-positive Identifizierungen von Pflanzen detektiert, die unter anderem auf fehlerhafte Abschnitte der Pflanzen-Genomsequenzen in den Datenbanken zurückzuführen sind. Derzeit werden bioinformatische Filtermethoden entwickelt, um solche Irrtümer zu erkennen und zu vermeiden.
- Bei naher Verwandtschaft von Taxa können über Artgrenzen konservierte DNA-Sequenzen in gewissem Umfang zu falschen Zuordnungen durch die verwendeten bioinformatischen Klassifizierungswerkzeuge führen. Dadurch ist eine Auflösung insbesondere auf Art-Niveau nicht immer möglich und oft auf die Gattung, bisweilen auch die Familie, beschränkt.

Metabarcoding

- Beim *Metabarcoding* spielt – im Gegensatz zu *Metagenomics* – die Auswahl der Barcodes eine bedeutende Rolle. Sie sind entscheidend für die taxonomische Identifizierung der Spezies in den Proben. Für das Pflanzen-*Metabarcoding* stehen mehrere Barcodes zur Verfügung. Die offiziellen Barcodes der Sequenzdatenbank BOLD sind *matK* und *rbcL*. Zu weiteren üblichen Barcodes gehören *psbA-trnH*, *trnL-trnH* und ITS2. Ein Konsens über den besten pflanzlichen Barcode oder eine Kombination mehrerer Barcodes muss noch gefunden werden und ist Gegenstand aktueller Diskussionen. In der Praxis hat sich ITS2 als Barcode für das *Metabarcoding* bewährt, weil dieser einen guten Kompromiss aus der Fähigkeit zur Sequenzgewinnung, der taxonomischen Auflösung und der hohen Verfügbarkeit von Referenzsequenzen in Datenbanken bietet¹¹. In unseren Untersuchungen konnte jedoch ein Teil der erhaltenen Sequenzen keinem Eintrag in den vorhandenen Datenbanken zugeordnet werden, weil nicht von allen Honig-relevanten Pflanzenarten Sequenzen hinterlegt oder die Einträge unvollständig sind. ITS2 ist in seiner Anwendung weiterhin limitiert, da der sogenannte Barcode-Gap für einige eng verwandte Arten stark reduziert oder nahezu gleich sein kann. Einige Pflanzengattungen (oder in einigen Fällen sogar Familien) werden dadurch kaum unterscheidbar, während andere eine ausreichende Diversität für eine klare Abgrenzung besitzen. Dies macht den Einsatz weiterer Barcodes erforderlich. Eine Fehleinschätzung in der Häufigkeit einzelner Arten kann bei der Verwendung von ITS-Barcodes zustande kommen, da (1) sie in unterschiedlicher Kopienanzahl in Pflanzenarten und sogar -individuen vorkommen, (2) der ITS2-Abschnitt in seiner Länge variabel ist, was in der PCR zu einer besseren Vervielfältigung kürzer Abschnitte führt und (3) der verwendete DADA2-Algorithmus bei der bioinformatischen Auswertung auf die variablen Längen eingestellt werden muss, da andernfalls die Ergebnisse verzerren würden. Diese Aspekte führen unter anderem dazu, dass die gefundenen Häufigkeiten von Arten nach *Metabarcoding* nicht den realen Anteilen in einer Probe entsprechen.

¹¹ Chen *et al.* (2010) Validation of the ITS2 Region as a Novel DNA Barcode for Identifying Medicinal Plant Species. *PLoS ONE* 5(1): e8613. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008613>

- Für die Anwendungen im botanischen Bereich gibt es wenig bis keine Alternativen zu ITS2. Bis zur Entwicklung eines besseren Barcodes müssen die Unzulänglichkeiten und Einschränkungen der ITS2-Barcodes bei der Interpretation von Ergebnissen berücksichtigt werden¹².
- Generell sind im Vergleich zur *Metagenomics*-Methode beim *Metabarcoding* deutlich mehr Sequenzeinträge von Pflanzengenomabschnitten in den Datenbanken vorhanden, was zu einer besseren Abdeckung des Artenspektrums führt. Falsch-positive Ergebnisse traten jedoch auch bei *Metabarcoding* auf, was auf fehlerhafte Sequenzeinträge zurückzuführen ist.
- Falsch-negative Ergebnisse für einzelne Pflanzenarten können zusätzlich auch dadurch verursacht werden, dass die DNA-Extraktion aus Pollen aus diesen Pflanzenarten nicht erfolgreich war.

Metagenomics und Metabarcoding

- Während bei zuvor in den Medien präsentierten Ergebnissen von Honig-Analysen ein reduziertes pflanzliches Artenspektrum als Hinweis auf Honig-Verfälschung interpretiert wurde, erwiesen sich in der Analyse der Arbeitsgruppe die Großhandelshonige konsistent als deutlich artenreicher als die getesteten deutschen Imkerhonige. Dies ist nicht unerwartet, da Großhandelshonige oft Mischungen aus Honigen verschiedener Imkereien aus dem In- und Ausland darstellen.
- Die verwendeten DNA-Sequenzdatenbanken haben derzeit einen „westlichen“ Bias, da DNA-Sequenzen für Honig-relevante Pflanzen aus verschiedenen Kontinenten nicht in gleichem Maße hinterlegt sind. So sind DNA-Sequenzen insbesondere für landestypische Pflanzen aus Asien und Südamerika stark unterrepräsentiert (siehe auch Punkt 6)¹³.
- Darüber hinaus sollte beachtet werden, dass zahlreiche Parameter die DNA-Profile beeinflussen können (z. B. Erhitzung, Robustheit der Pollen, Einfluss von Hefen).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass für die Vergleichbarkeit von Ergebnissen die Durchführung der DNA-Extraktion und der NGS-Analyse nach Standardprotokollen für *Metabarcoding* und *Metagenomics* erforderlich ist. In Bezug auf die Auflösung der Pflanzentaxa ist der *Metabarcoding*-Ansatz derzeit dem *Metagenomics*-Ansatz überlegen, da deutlich mehr artspezifische Barcodes für die Pflanzenbestimmung zur Verfügung stehen.

6 Botanische Zusammensetzung als Indiz für die geografische Herkunft

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die DNA-Analytik mittels NGS für die Bestimmung der botanischen Zusammensetzung grundsätzlich geeignet ist und somit auch Hinweise zur geografischen Herkunft liefern kann (analog zur mikroskopischen Pollenanalyse). Allerdings fehlen bislang harmonisierte analytische Kriterien für die standardisierte Beurteilung von Sortenhonigen mittels NGS. Derzeit stellt daher die mikroskopische Pollenanalyse die standardisierte (L 40.00–11 und DIN 10760:2002¹⁴) und rechtlich etablierte Methode dar. Für die Beurteilung der botanischen und geografischen Herkunft werden bei der mikroskopischen Pollenanalyse folgende Kriterien in Kombination betrachtet:

1. die Pollenzusammensetzung und deren relative Anteile,
2. Vorhandensein von Honigtauelementen,
3. der Abgleich des Pollenspektrums mit der regionalen Flora, sowie
4. die absolute Pollenanzahl.

¹² Kauserud (2023). ITS alchemy: On the use of ITS as a DNA marker in fungal ecology. *Fungal Ecology*, 65, 101274.

<https://doi.org/10.1016/j.funeco.2023.101274>

¹³ Marks et al. (2021). Representation and participation across 20 years of plant genome sequencing. *Nature plants*, 7(12), 1571–1578.

<https://doi.org/10.1038/s41477-021-01031-8>

¹⁴ DIN 10760:2002-05/ BVL L 40.00-11:2003-12 (Übernahme der gleichnamigen Deutschen Norm DIN 10760) (2002). Untersuchung von Honig - Bestimmung der relativen Pollenhäufigkeit.

Das mikroskopische Bild ist dabei nur eines von drei Kriterien, die für eine Sortendeklaration übereinstimmen müssen, denn es muss stets im Zusammenhang mit den organoleptischen Eigenschaften und den chemisch-physikalischen Parametern interpretiert werden. Dies erfordert einen hohen Erfahrungswert. Welche Zusammenhänge zwischen *Metabarcoding*/*Metagenomics* und sensorischen sowie chemisch-physikalischen Eigenschaften bestehen, muss in Zukunft näher untersucht werden.

Der direkte Methodenvergleich zwischen NGS-Analytik und der mikroskopischen Pollenanalyse innerhalb der Projektgruppe zeigte sowohl Übereinstimmungen als auch Unterschiede bei den detektierten Pflanzentaxa. Diese Beobachtungen sind auch aus der Literatur bekannt: Hier konnte eine hohe Übereinstimmung bei dominanten Pflanzenarten und eine geringere Übereinstimmung bei seltenen Taxa gezeigt werden^{15,16}.

In der mikroskopischen Pollenanalyse wird die geografische Herkunft anhand von Markerpollen und bestimmten Pollenkombinationen bestimmt. Für eine präzise pflanzengeographische Einordnung mit Hilfe der DNA-Analytik müssen Pollen in der Mikroskopie und in der NGS-Analytik vergleichbar detektiert werden. Die für Honige relevanten Pflanzenarten sollten in den Datenbanken also möglichst vollständig vertreten sein und müssen bei *Metabarcoding* durch die gewählten Barcodes vervielfältigt werden können. Dabei kann es sich auch um kommerziell nicht relevante Pflanzen handeln, wie beispielsweise Wildpflanzen in Lateinamerika. Nach Möglichkeit müssten daher dedizierte Sequenz-Datenbanken mit Barcode-Regionen für *Metabarcoding* bzw. mit relevanten Gesamtgenomen für *Metagenomics* aufgebaut werden.

Für die *Metagenomics*-Daten wurden auf Grundlage der Pflanzen-Taxonlisten sowie parallel auf Basis der erweiterten Artenlisten (Pflanzen plus Tiere, Pilze, Bakterien, Viren) die Unterschiedlichkeit bzw. Ähnlichkeit der Honig-DNA-Profile mit Hilfe der Hauptkomponentenanalyse (PCA) dargestellt. Dabei zeigten die Großhandelshonige verschiedener Marken eine deutliche Ähnlichkeit zueinander, was auf die Verwendung ähnlicher Honigquellen aus der EU und von außerhalb der EU durch die großen Handelsketten hinweist. Deutsche Imker-Honige waren zum Teil sehr deutlich von den Großhandelsproben unterscheidbar. Allerdings stand nur eine limitierte Anzahl solcher Imker-Honige zur Verfügung. Es ist daher ein Ziel, die Variabilität von authentischen Imker-Honigen durch Sequenzierung einer deutschlandweit gesammelten Honig-Auswahl systematisch zu erfassen. Dies wäre nur im Rahmen eines finanzierten Projekts möglich.

7 Limitationen der Vergleichbarkeit von *Metabarcoding*- und *Metagenomics*-Daten

Metabarcoding- und *Metagenomics*-Datensätze sind mit ihrer definierten und unterschiedlichen Sequenzierentiefe (= Anzahl der Reads) als „kompositionelle“ Datensätze zu betrachten¹⁷. Diese geben zunächst die Häufigkeit der gefundenen Sequenzen in einer Probe als Anzahl von Reads pro Sequenzvariante (hier: Taxon) an. Diese Zahlenwerte sind absolut und einzeln betrachtet ohne Aussage und werden daher nach Normalisierung typischerweise als relative Anteile des Gesamtdatensatzes in Prozent dargestellt. Zusätzlich eingebrachte Komponenten (= Reads weiterer Taxa) können aber die gefundenen prozentualen Verhältnisse bereits etablierter Komponenten verringern, obwohl sich die absolute Menge der etablierten Komponenten nicht verändert hat (Verdrängung). Auch die absolute Zu- oder Abnahme der Menge einzelner Komponenten verändert selbstverständlich die relative Zusammensetzung der Komposition. Daher ist es nicht möglich, von relativen Verhältnissen kompositioneller Datensätze auf absolute Mengen in einer Probe zu schließen.

Insbesondere für die Anwendung des *Metabarcodings* können diese prozentualen Zahlen ein mögliches Problem bei der Vergleichbarkeit und Interpretation von Ergebnissen darstellen. Wird zum Beispiel eine Art im *Metabarcoding* nicht ermittelt, sei es durch das Misslingen DNA-Extraktion oder der anschließenden PCR oder durch fehlende Zuordnung der generierten Sequenz aufgrund unvollständiger Datenbankeinträge, werden die

¹⁵ Hawkins *et al.* (2015). Using DNA metabarcoding to identify the floral composition of honey: A new tool for investigating honey bee foraging preferences. *PLoS ONE*, 10(8), e0134735. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134735>

¹⁶ Özkök *et al.* (2023). Comparing the melissopalynological and next generation sequencing (NGS) methods for the determining of botanical origin of honey. *Food Control*, 148, 109630. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.109630>

¹⁷ Gloor *et al.* (2017) Microbiome Datasets Are Compositional: And This Is Not Optional. *Front. Microbiol.* 8:2224. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02224>

sicher ermittelten Arten einen größeren prozentualen Anteil einnehmen. Umgekehrt verringern beim Vergleich von Proben zusätzlich eingebrachte Arten die prozentualen Anteile bereits bestehender Arten an der Gesamtsumme (100 %). Das Problem der Vergleichbarkeit von Analysen gilt nicht in gleichem Maße für *Metagenomics*, sofern hier die gleiche Genomdatenbank eingesetzt wird und auch nicht klassifizierbare Read-Anteile erkannt und prozentual ausgewiesen werden.

8 Abgrenzung zum genetischen Fingerabdruck

Die durch *Metabarcoding* oder *Metagenomics* produzierten Taxonlisten ergeben ein DNA-Profil, das fälschlicherweise häufig als DNA-Fingerprint bezeichnet wird. Wir weisen darauf hin, dass ein Honig-DNA-Profil weder semantisch noch methodisch mit dem in der Forensik etablierten genetischen Fingerabdruck gleichzusetzen ist. Die beim genetischen Fingerabdruck ermittelten Allellängen hochvariabler Genom-Loci sind in der DNA des Individuums genetisch verankert und bleiben lebenslang unverändert, während die DNA in einem Honig aus externen Quellen unterschiedlichster Lebensformen stammt und somit eine Momentaufnahme, z.B. einer Charge oder einer Jahreszeit, darstellt. Zudem dürfte in den seltensten Fällen für einen zu analysierenden Honig ein entsprechender Referenzhonig als Vergleich in Datenbanken vorhanden sein. Zusätzlich können auch unterschiedliche Mischungsverhältnisse verschiedener Honige zu einzigartigen DNA-Honigprofilen führen. Ebenfalls muss erarbeitet und offengelegt werden, wie die Übereinstimmung beziehungsweise Abgrenzung von Honig-DNA-Profilen zu Profilen in einer Vergleichsdatenbank zu bewerten ist.

Biologische Profile werden in der Forensik angewendet. In der Rechtsprechung ist ihre Anwendung jedoch keine Routine. Sie dienen als qualifizierte Indizien oder Sachverständigenbeweise, jedoch sind sie, anders als der genetische Fingerabdruck nicht fest in der Strafprozessordnung verankert.

9 Akkreditierung nach DIN EN ISO/IEC 17025

Wie in den Medien bereits berichtet wurde, ist Celvia CC AS seit dem 01.04.2026 nach DIN EN ISO/IEC 17025 akkreditiert¹⁸. Allerdings handelt es sich bei der Akkreditierung nicht um einen ISO-Standard der Methode selbst. Sie zeigt in erster Linie, dass das Labor nach definierten Qualitäts- und Prozessanforderungen arbeitet, d.h. es hat seine Abläufe dokumentiert, eine Qualitätssicherung etabliert und arbeitet reproduzierbar nach einem geprüften System. Dies ersetzt jedoch nicht den wissenschaftlichen Nachweis, dass die Methode für genau die betrachtete Fragestellung robust, spezifisch und auf andere Labore übertragbar ist. Da die Methode weiterhin nicht öffentlich zugänglich ist und keine Publikation in einem begutachteten Fachjournal vorliegt, fehlt den Fachexperten eine transparente, nachvollziehbare Grundlage, um die Eignung der Methode für bestimmte Fragestellungen einschätzen zu können. Die Akkreditierung führt also nicht automatisch zu der Aussage, dass die Methode zur Überprüfung der Echtheit von Honigen geeignet ist. Deshalb kann eine akkreditierte Methode fachlich trotzdem umstritten bleiben.

10 Fazit

NGS ist eine moderne Analysetechnik, die sich rasant weiterentwickelt und ein erhebliches Potenzial für bestimmte Fragestellungen der Authentizitätsprüfung von Honig besitzt. Weitere Untersuchungen werden einen Zugewinn an Wissen bringen, allerdings auch die Grenzen dieser Methoden aufzeigen. Die Untersuchungen der Projektgruppe NGS-Honig legen nahe, dass NGS für den Nachweis eines Zusatzes von Zuckersirupen nicht die geeignete Analysetechnik ist. Abhängig vom eingesetzten Sirup sind für einen solchen Nachweis aber bereits verschiedene analytische Methoden verfügbar beziehungsweise in der Entwicklung. Neben der erwähnten ¹H-NMR zählen hierzu unter anderem (Stabilisotopen-)massenspektrometrische Verfahren.

¹⁸ <https://www.zdfheute.de/panorama/fake-honig-erkennen-dna-test-supermarkt-akkreditierung-100.html>, 29.04.2026

Die Projektgruppe sieht das Potential von NGS-Verfahren vor allem bei der Überprüfung der botanischen Zusammensetzung und der geografischen Herkunft. Wie vom Joint Research Centre gefordert, muss die Leistungsfähigkeit von NGS-Verfahren vor dem Einsatz in der Routine anhand von Ringversuchen und Laborvergleichsstudien bewertet werden¹⁹. Die Verfahrensetablierung sollte sich auf folgende Aspekte fokussieren:

1. Die Vorgehensweise bei der DNA-Extraktion sowie beim *Metabarcoding* die Wahl der verwendeten Barcode-Primer müssen vor Anwendung in der Routine standardisiert werden.
 2. Die *Metagenomics*-Untersuchungen zeigen derzeit noch Lücken und Qualitätsprobleme in den öffentlich zugänglichen DNA-Sequenzdatenbanken auf. Bei Pflanzen ist die Auflösung von Arten aufgrund der beschränkten Anzahl von verfügbaren Pflanzengenomen eingeschränkt. Daher kann *Metagenomics* für die Bewertung des Pflanzenspektrums (noch) nicht mit dem *Metabarcoding*-Ansatz schritthalten, da derzeit deutlich mehr artspezifische Barcodes in den öffentlich zugänglichen Sequenzdatenbanken für die Pflanzenbestimmung vorhanden sind. Auch beim *Metabarcoding* konnten einige Sequenzen nicht zugeordnet werden, was zeigt, dass nicht alle in Honig vorkommenden Pflanzenarten in den verwendeten DNA-Sequenzdatenbanken enthalten sind oder mittels der eingesetzten Barcode-Primer nicht amplifiziert wurden. Eine systematische Erweiterung von Referenzdatenbanken für Honig ist daher dringend erforderlich.
 3. *Metabarcoding*- und *Metagenomics*-Methoden werden aufgrund ihrer kompositionellen Natur der ermittelten Daten nicht uneingeschränkt für einen allgemeinen Qualitätstest etablierbar sein. Als Naturprodukt unterliegt Honig von Natur aus Schwankungen, deren Einfluss nicht vollständig von NGS-Methoden erfasst werden können. Darüber hinaus können die natürlichen und saisonalen Schwankungen bei DNA-Analysen die relative Zusammensetzung der DNA-Sequenzen verändern und zu fehlerhaften Annahmen bezüglich der Qualität und Authentizität des Honigs führen. Auch die angeführten Beschränkungen bei der praktischen Durchführung der Methoden wie die Verfügbarkeit von authentischen, überprüften Referenzsequenzen und -genomen, geeigneten Klassifizierungsprogrammen sowie von universell anwendbaren Barcoding-Primern beeinflussen die Zusammensetzung der kompositionellen Daten, unabhängig von der Beschaffenheit der Probe. Eine Übertragung auf absolute Mengenverhältnisse wird nicht möglich sein.
- Zurzeit können *Metabarcoding*/*Metagenomics* nur in vergleichender Kombination mit der standardisierten mikroskopischen Pollenanalyse genutzt werden, um spezielle Honigbestandteile auf Taxon-Ebene besser aufzulösen und somit zur Beantwortung spezieller Fragestellungen beizutragen. Als übergeordnetes, alleiniges Qualitätsmerkmal für alle Honige sind NGS-Methoden derzeit aufgrund ihrer inhärenten Limitationen unserer Erkenntnisse und Auffassung nach nicht geeignet.
4. Eine Validierung der NGS-Ansätze mit weiteren Vergleichen zur mikroskopischen Pollenanalyse sowie einer Etablierung von harmonisierten analytischen Kriterien für die standardisierte Interpretation der Ergebnisse steht bei der Beantwortung spezifischer Fragestellungen für den Einsatz in der Routine aus.

¹⁹ Pellegrin, Linsinger & Alvarellos (2026). Of bees and buzz: towards validated NGS-based methods in honey authentication. *npj Science of Food*, 10(1), 129. <https://doi.org/10.1038/s41538-026-00839-y>