

## WYSTĘPOWANIE BAKTERII GLEBOWYCH Z RODZAJU *Arthrobacter* ssp. W UPRAWIE ŻYTA OZIMEGO ORAZ ICH ENZYMATYCZNE I ANTAGONISTYCZNE WŁAŚCIWOŚCI

Róża Głazewska-Maniewska, Agnieszka Maciejewska,  
Aleksander Melech

Akademia Techniczno-Rolnicza w Bydgoszczy

**Streszczenie.** Doświadczenie przeprowadzono na szczepach bakterii *Arthrobacter* ssp. wyizolowanych z ryzosfery, ryzoplany i endoryzoplany żyta ozimego. Mikroorganizmy badano pod względem ich aktywności enzymatycznej i antagonistycznej w stosunku do grzybów patogennych. Stwierdzono wysoką aktywność izolowanych szczepów w procesie hydrolizy białka, pektyn, skrobi i lecytyny. U wszystkich badanych szczepów stwierdzono obecność enzymu katalazy. Mikoantagonizm bakterii z rodzaju *Arthrobacter* badano w stosunku do grzybów z rodzaju *Fusarium*. Uzyskane wyniki analiz mikrobiologicznych i statystycznych pozwalają stwierdzić, że silnie antagonistyczne szczepy bakterii z rodzaju *Arthrobacter* częściej występują w strefie ryzosferowej gleby.

**Słowa kluczowe:** antagonizm, *Arthrobacter*, hydroliza, *Fusarium*

### WSTĘP

Drobnoustroje rozwijają się w ścisłej współzależności z roślinami od momentu kiełkowania nasion aż do czasu osiągnięcia przez roślinę pełnej dojrzałości. Zjawisko to często bywa ignorowane zarówno przez fizjologów, jak i rolników, budzi natomiast duże zainteresowanie mikrobiologów [Pietr 1990]. Mikroorganizmy ryzosferowe mogą być obojętne dla roślin bądź też wywierać korzystny lub szkodliwy wpływ na ich wzrost. Z tego powodu, jednym z ważniejszych problemów biologii gleby jest poznanie mechanizmów wzajemnego oddziaływania na siebie roślin, drobnoustrojów saprofitycznych i patogenów glebowych [Różycki i Strzelczyk 1985, Strzelczyk 1988].

Bakterie z rodzaju *Arthrobacter* są mikroorganizmami gramdodatnimi, u których stwierdzono właściwości antagonistyczne w stosunku do patogenów glebowych [Hage-

dorn i in. 1989]. Bakterie te należą do różnych grup fizjologicznych i dlatego mogą uczestniczyć w przemianach związków organicznych i mineralnych odpowiedzialnych za biologiczną aktywność środowiska, w którym żyją [Gounot 1967, Hagedorn i Holt 1979]. Substraty uwalniane przez *Arthrobacter* do środowiska glebowego (czynniki wzrostu, witaminy, aminokwasy i inne) nie tylko regulują rozwój roślin, ale i warunkują obecność innych drobnoustrojów. Oddziaływanie to może dotyczyć zarówno mikroorganizmów saprofitycznych, jak i patogenów [Różycki i Strzelczyk 1985]. Fizjologiczne i biochemiczne właściwości *Arthrobacter* ssp. stanowią podstawę do specyfikacji funkcji tych bakterii jako autochtonicznego przedstawiciela ryzosfery oraz stwarzają możliwość ich ewentualnego wykorzystania w mikrobiologicznych metodach walki z patogenami roślin uprawnych.

Celem poniższej pracy było poznanie wpływu bakterii z rodzaju *Arthrobacter* ssp. na grzyby glebowe z rodzaju *Fusarium*. Równocześnie prowadzono badania nad aktywnością enzymatyczną tych bakterii.

## MATERIAŁ I METODY

Badaniami objęto ryzosferę, ryzoplano i endoryzoplano żyta ozimego uprawianego na glebach lekkich pływach, należących do żytznego kompleksu glebowego. Próby do badań pobierano spod roślin w fazie krzewienia.

W pobranych próbach oznaczono ogólną liczbę bakterii na podłożu dla mikroorganizmów glebowych według Bunt i Rovira [1955]. Bakterie *Arthrobacter* izolowano na pożywce selektywnej [Hagedorn i Holt 1979], do dalszych badań wykorzystano 40 izolatów (po 15 z ryzosfery i ryzoplany, 10 z endoryzoplany).

Aktywność enzymatyczną oceniano na podstawie obecności stref hydrolizy odpowiedniego substratu zawartego w podłożu. Właściwości hydrolityczne badano na:

- podłożu z pektynami pH 8 [Hankin i in. 1971],
- podłożu ze skrobią według Boguszewskiej [1980],
- podłożu z żelatyną według Sobczaka i in. [1978],
- podłożu z lecytyną (pożywka Pikowskiej [1948] wzbogaconą lecytyną z jaja kurzego).

Dodatkowo sprawdzano zdolności szczepów do redukcji azotanów, wykorzystywania  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  jako jedyne źródła fosforu [Pikowska 1948] i wytwarzania katalazy.

Równoległe z testami biochemicznymi prowadzono badania nad właściwościami antagonistycznymi. W doświadczeniach wykorzystano trzy gatunki grzybów patogennych z rodzaju *Fusarium*: *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae*.

Antagonistyczne oddziaływanie bakterii z rodzaju *Arthrobacter* na testowane grzyby obliczono według zmodyfikowanej skali Coopera-Chiltona (za Johnsonn, 1960). Na podstawie uzyskanych wyników oznaczono współczynniki korelacji pomiędzy cechami biochemicznymi bakterii *Arthrobacter* a ich aktywnością antagonistyczną w stosunku do wybranych grzybów patogennych. Wyniki pogrupowano również z uwagi na aktywność antagonistyczną badanych mikroorganizmów, wykorzystując statystyczną metodę analizy skupień na podstawie grupowania według k-średnich. Dodatkowo przeprowadzono analizę struktury wewnętrznej skupień. Obliczenia wykonano za pomocą programu STATISTICA®.

## WYNIKI

Liczebność bakterii oszacowano procentowo porównując liczebność bakterii z rodzaju *Arthrobacter* na pożywce selektywnej [Hagedorn i Holt 1979] z liczebnością jtk ogólnej liczby bakterii wyizolowanych na pożywce według Bunt i Rovira [1955] z ryzosfery, ryzoplany i endoryzoplany żyta ozimego (tab. 1). Najwięcej bakterii *Arthrobacter* ssp. występowało w glebie ryzosferowej, natomiast środowiskiem najrzadziej zasiedlanym przez te mikroorganizmy było wnętrze korzeni żyta ozimego.

Tabela 1. Procentowy udział bakterii *Arthrobacter* ssp. w ogólnej populacji bakterii wyizolowanych spod uprawy żyta ozimego

Table 1. Percentage of *Arthrobacter* strains in the total count of bacteria isolated from soil drilled with winter rye

Procentowy udział bakterii <i>Arthrobacter</i> w ogólnej liczebności bakterii Percentage of <i>Arthrobacter</i> in the total count of bacteria	Wyizolowane frakcje – Fractions isolated				
	Ryzosfera Rhisosphere (I)	(II)	Ryzoplana Rhisoplane (III)	(IV)	Endoryzoplana Endorhisoplane (V)
	23,1	12,7	12,1	18,3	4,8

Testowane mikroorganizmy powszechnie wykorzystywały skrobię i pektynę jako jedyne źródło węgla i energii, hydrolizowały także zawarte w podłożu proteiny (tab. 2).

Prowadzone doświadczenia dowiodły, że ponad 60% badanych szczepów produkowało pektynazy, a tylko 42% – amylazy. Wszystkie testowane szczepy *Arthrobacter* ssp. wykazywały aktywność proteolityczną. Zdolność do rozpuszczania mineralnych połączeń fosforu nie jest szeroko rozpowszechniona u bakterii *Arthrobacter* ssp., około 20% izolatów z ryzosfery i endoryzoplany rozpuszczało trójfosforan wapnia zawarty w podłożu, a wśród szczepów ryzoplany nie stwierdzono zdolności do wykorzystywania fosforu z  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (tab. 2).

Tabela 2. Udział szczepów *Arthrobacter* ssp. w przemianach związków zawierających fosfor oraz wykorzystywaniu różnych źródeł węgla i energii

Table 2. Percentage of *Arthrobacter* bacteria in phosphorus compounds transformation and utilization of different sources of carbon and energy

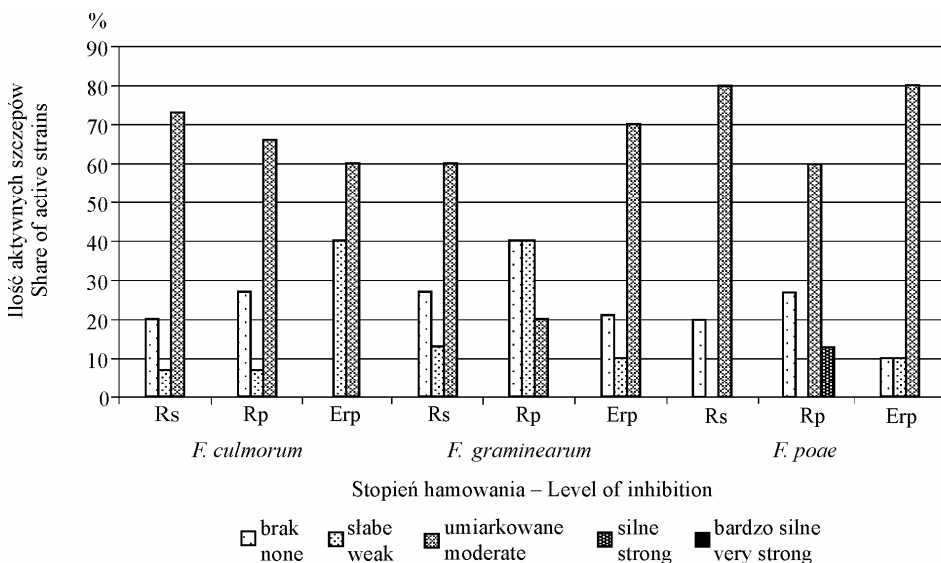
Liczba szczepów Number of strains	Właściwości – Properties					
	Rozpuszczanie $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ Dissolving $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Hydroliza lecycyny Lecithin hydrolysis	Hydroliza pektyn Pectin hydrolysis	Hydroliza skrobi Starch hydrolysis	Hydroliza białka Protein hydrolysis	Redukcja azotanów Nitrates reduction
Ryzosfera Rhisosphere	3	8	9	9	15	7
Ryzoplana Rhisoplane	0	6	10	4	15	1
Endoryzoplana Endorhisoplane	2	6	7	4	10	4
Ogółem Total	5	20	26	17	40	12

Organiczne związki fosforu (lecycyna) okazały się być łatwiej dostępnym źródłem fosforu dla bakterii z rodzaju *Arthrobacter*. Zdolności hydrolizowania lecytyny zaobserwowano u ponad 50% badanych szczepów (tab. 2).

Bakterie z rodzaju *Arthrobacter* ssp. wykazywały również aktywność w procesach dysymilacyjnej redukcji azotanów. Z przebadanych szczepów 38,8% wykorzystywało azotany jako ostateczny akceptor  $H_2$  w procesach oddechowych. Większość z nich redukowało azotany do azotynów (25,5%). Najbardziej aktywne były szczepy wyizolowane z ryzosfery. Redukcję azotanów do  $N_2$  stwierdzono u bakterii pochodzących z endoryzoplany (około 20% szczepów wyizolowanych z wnętrza korzeni).

U wszystkich badanych szczepów stwierdzono obecność katalazy. Ze względu na fakt, że wytwarzanie tego enzymu stanowi u *Arthrobacter* ssp. cechę taksonomiczną, wynik testu stanowił dodatkowe potwierdzenie trafności identyfikacji badanych szczepów [Muller i Antheunisse 1963].

Antagonistyczne oddziaływanie bakterii z rodzaju *Arthrobacter* przedstawiono na rysunku 1.



Stopnie hamowania według skali Cooprea-Hiltona – Level of inhibition following the Coopre-Hilton scale: 0% – brak – none, 1-25% – słabe – weak, 26-50% – umiarkowane – moderate, 51-75% – silne – strong, 76-100% – bardzo silne – very strong

Rs – ryzosfera – rhizosphere, Rp – ryzoplana – rhizoplane, Erp – endoryzoplana – endorhizoplane

Rys. 1. Właściwości antagonistyczne bakterii *Arthrobacter* wyizolowanych z ryzosfery, ryzoplany i endoryzoplany żyta ozimego w stosunku do grzybów z rodzaju *Fusarium*

Fig. 1. Antagonistic activity of *Arthrobacter* bacteria strains isolated from winter rye rhizosphere, rhizoplane and endorhizoplane against *Fusarium* genus fungi

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono aktywność izolatów w hamowaniu wzrostu patogenicznych grzybów z rodzaju *Fusarium*; najsilniej hamowany był wzrost *F. poae* (rys. 1). Najmniej wrażliwym na działanie bakterii *Arthrobacter* ssp. okazał się gatunek *F. graminearum*. Większość szczepów *Arthrobacter* ssp. wykazywała umiar-

kowaną bądź słabą siłą inhibicji w stosunku do grzybów z rodzaju *Fusarium*. Zaledwie 1% testowanych izolatów mógłby być wykorzystany jako efektywny czynnik biokontroli populacji tych patogenów (70% ograniczenie wzrostu grzybni).

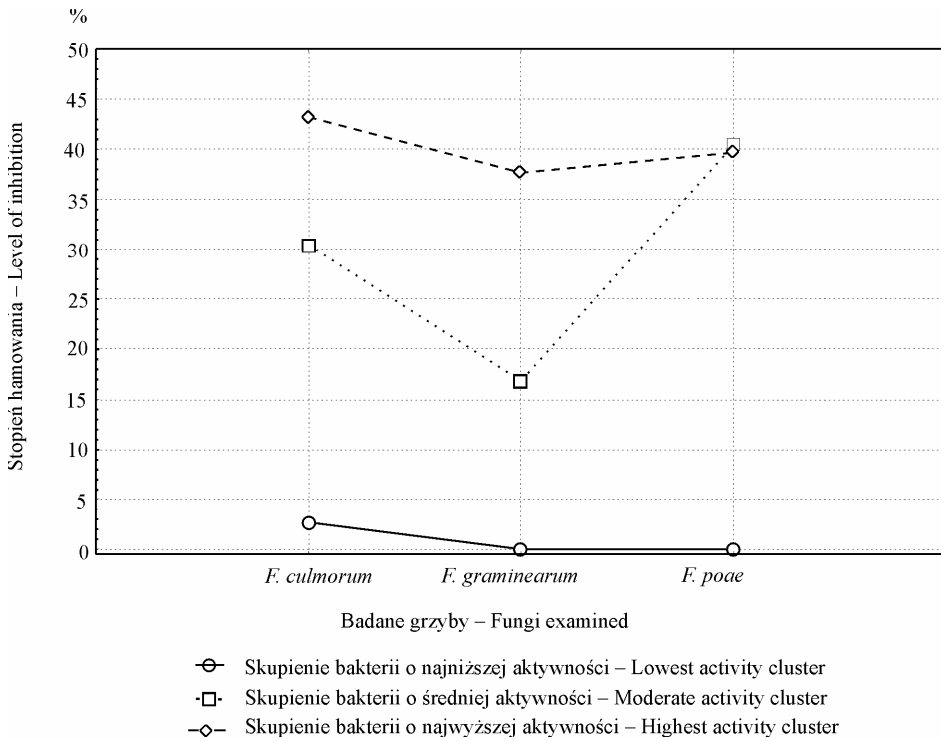
Przeprowadzona analiza korelacji pomiędzy występowaniem cech biochemicznych a właściwościami antagonistycznymi badanych bakterii (tab. 3) wykazała istnienie istotnie negatywnej zależności pomiędzy syntezą pozakomórkowych pektynaz a inhibicją patogennych grzybów. Pozostałe cechy wykazywały wprawdzie korelacje dodatnie, ale statystycznie nieistotne. Najwyższe wartości stwierdzono dla powiązań pomiędzy występowaniem właściwości proteolitycznych a aktywnością antagonistyczną w stosunku do testowanych patogenów.

Tabela 3. Współczynniki korelacji między cechami biochemicznymi bakterii *Arthrobacter* ssp. a ich aktywnością antagonistyczną w stosunku do wybranych gatunków grzybów  
Table 3. Correlation coefficients between selected biochemical properties of *Arthrobacter* ssp. bacteria and their antagonistic activity towards the fungal pathogens tested

Właściwości biochemiczne Biochemical properties	Hamowanie wzrostu – Growth inhibition		
	<i>Fusarium culmorum</i>	<i>Fusarium graminearum</i>	<i>Fusarium poae</i>
Hydrolyza pektyn Pectin hydrolysis	-0,323*	-0,154	-0,291
Hydrolyza skrobi Starch hydrolysis	0,192	0,297	0,220
Hydrolyza białka Proteins hydrolysis	0,293	0,291	0,213
Rozpuszczanie $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ Dissolving $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	0,217	0,039	0,176
Hydrolyza lecytyny Lecithin hydrolysis	0,159	-0,003	0,142
Redukcja azotanów Nitrates reduction	0,113	0,208	-0,012

\* współczynnik istotny – significant coefficient

Wyniki analizy skupień na podstawie aglomeracji badanych szczepów pod względem ich aktywności antagonistycznej na podstawie k-średnich pozwoliły na wyodrębnienie trzech skupień w zależności od stopnia inhibicji badanych grzybów (rys. 2). Skupienie I obejmuje szczepy o niskiej aktywności antagonistycznej w stosunku do grzybów z rodzaju *Fusarium*. W skupieniu II znajdują się bakterie w dużym stopniu hamujące rozwój testowych patogenów. Przeprowadzona analiza porównawcza struktury wewnętrznej skupień wykazała istotnie większy udział szczepów wyizolowanych z ryzofery w skupieniu III oraz udział szczepów endoryzoplanowych w skupieniu II (tab. 4).



Strukturę skupień prezentuje tabela 4 – The cluster structure is presented in Table 4

Rys. 2. Średnie oddziaływania antagonistycznego poszczególnych skupisk bakterii na badane grzyby patogenne z rodzaju *Fusarium*

Fig. 2. Mean values for antagonistic cluster activity towards pathogenic *Fusarium* genus fungi

Tabela 4. Struktura skupień uzyskana na podstawie analizy aktywności antagonistycznej bakterii *Arthrobacter* metodą aglomeracji z wykorzystaniem k-średnich

Table 4. Cluster structure of *Arthrobacter* ssp. strains obtained from antagonistic activity analysis with k-means agglomeration method

Fracje Fractions	Liczba testowanych szczerpów Number of strains tested	Liczba szczerpów w poszczególnych skupieniach Number of strains in each cluster		
		I	II	III
Ryzosfera – Rhizosphere	15	3	3	9
Ryzoplana – Rhizoplane	15	4	7*	4
Endoryzoplana	10	1	6	3
Endorhizoplana				
Ogółem Total	40	8	16	16

Skupienie I – szczepy najmniej aktywne – Cluster I – least active strains

Skupienie II – szczepy o przeciętnej aktywności – Cluster II – strains of average activity

Skupienie III – szczepy o najwyższej aktywności antagonistycznej – Cluster III – strains of the highest antagonistic activity

\* istotna statystycznie – significant

## DYSKUSJA

Uzyskane wyniki świadczą o tym, że bakterie z rodzaju *Arthrobacter* stanowią istotny element mikroflory środowiska glebowego. Badania innych autorów wskazują, że wspólnie z *Corynebacterium* mogą one stanowić ponad 50% ogólnej liczby bakterii w glebie [Kunicki-Goldfinger 1998].

Zmiany liczebności bakterii z rodzaju *Arthrobacter* w zależności od miejsca ich izolacji potwierdzają teorię, że populacja tych bakterii wzrasta wraz z oddalaniem się od powierzchni korzeni, a w glebie pozakorzeniowej osiąga poziom maksymalny. Może to być wynikiem ich niskich wymagań pokarmowych oraz zdolności do wykorzystywania składników występujących w bardzo niskich stężeniach [Morris 1960]. Prawdopodobne jest również istnienie niekorzystnych interakcji pomiędzy rodzajem *Arthrobacter* a mikroorganizmami zymogenowymi (np. *Pseudomonas*) [Rouatt i Katznelson 1961].

Aktywność enzymatyczna badanych szczepów wskazuje na ich istotną rolę w ekosystemie glebowym; szczególne znaczenie mogą mieć w przemianach związków białkowych. Najnowsze opracowania podają, że rodzaj *Arthrobacter* charakteryzuje się dużą aktywnością w zakresie syntezy pozakomórkowych proteinaz serynowych [Rozdziejewicz i Sobieszkański 1988].

Barabasz [1985] opisując drobnoustroje czynne w procesie dysymilacyjnej redukcji azotanów wymienia m.in. *Arthrobacter citreus*, *A. simplex* i *A. terragens*. Zdolność jednoczesnego utleniania i redukcji związków azotu nadaje tym bakteriom szczególne znaczenie ekologiczne [Gunner 1963]. Uzyskane dane wskazują, że redukcja azotanów występuje częściej u szczepów rezydujących w ryzosferze (tab. 2).

Wyniki badań właściwości antagonizacyjnych pozwalają stwierdzić, że wśród bakterii z rodzaju *Arthrobacter* spotyka się szczepy, które w znaczącym stopniu hamują rozwój patogenów. Podobne rezultaty uzyskały w swoich badaniach Kurek i Jaroszuk [1997], które wyizolowały z ektoryzosfery żyta ozimego dwa szczepy bakterii *Arthrobacter* ssp., silnie hamujące rozwój *F. culmorum* i *F. graminearum*, a jednocześnie wykazujące dużą aktywność proteolityczną. Odkryto także, że obecność tych drobnoustrojów znacznie ogranicza występowanie choroby rzodkiewek wywołanej przez *F. oxysporum* i *F. conglutinans* [Strzelczyk 1988] oraz choroby goździków powodowanej przez *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* [Kurek i Kobus 1990].

Trudno jest jednoznacznie stwierdzić, które cechy odpowiadają za antagonizyczną aktywność badanych szczepów z rodzaju *Arthrobacter*. Można przypuszczać, że jednym z mechanizmów inhibicji może być wytwarzanie i wprowadzanie do środowiska enzymów litycznych oraz innych metabolitów o charakterze antybiotycznym [Sobieszewski 1994]. Uzyskane z przeprowadzonych doświadczeń wyniki sugerują, że właściwości proteolityczne badanych bakterii mogą przyczyniać się do hamowania wzrostu grzybów z rodzaju *Fusarium*. Podobne wnioski przedstawiły w swojej pracy Kurek i Jaroszuk [1997]. Nie można również wykluczyć występowania zjawiska konkurencji o składniki pokarmowe warunkujące aktywność patogenów glebowych [Sobieszewski 1994].

## WNIOSKI

1. Liczebność populacji bakterii z rodzaju *Arthrobacter* wzrasta wraz z odległością od strefy korzeniowej.

2. Badane bakterie wykazują wysoką aktywność hydrolityczną skrobi, pektyn i protein, a jako źródło fosforu lepiej wykorzystują związki organiczne (lecycynę) niż mineralne połączenia tego pierwiastka [ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ].

3. Synteza enzymów proteolitycznych może być jednym z mechanizmów inhibicji patogennych grzybów w środowisku glebowym.

## PIŚMIENNICTWO

- Boguszewska J., 1980. Izolowanie i niektóre właściwości pozakomórkowych amylaz *Fusarium martii*. App. Et Wr. Var. Minus f.2. Acta Mycol. 16 (2), 237-245.
- Barabasz W., 1985. Denitryfikacja w świetle współczesnych badań mikrobiologicznych i ekologicznych. Post. Mikrobiol. 24 (1/2), 83-103.
- Bunt J.S., Rovira A.D., 1955. Microbiological studies of some subantarctic soil. J. Soil Sci. 56, 119-128.
- Gounot A.M., 1967. Role biologique des *Arthrobacter* dans les limons souterrains. Ann. Inst. Pasteur Paris, 113.
- Gunner H.B., 1963. Nitrification by *Arthrobacter globiformis*. Nature 197, 1127-1128.
- Hagedorn C., Holt J.C., 1979. Ecology of soil arthrobacters in Clarion-Webster top sequences of Iowa. Appl. Microbiol. 20, 254-258.
- Hagedorn C., Gould W.D., Bardinelli T.R., 1989. Rhizobacteria of cotton and their repression of seedling disease pathogens. Appl. Environ. Microbiol. 55, 2793-2797.
- Hankin L., Zucker M., Sands D.C., 1971. Improved solid medium for the detection and enumeration of pectolytic bacteria. Appl. Microbiol. 22 (2), 205-209.
- Kunicki-Goldfinger W.J.H., 1998. Życie bakterii. Wyd. VII, PWN Warszawa.
- Kurek E., Jaroszuk J., 1997. The in vitro Antagonism between Rhizobacteria and *Fusarium* Strains. Acta Microbiol. Pol. 46 (1), 65-73.
- Kurek E., Kobus J., 1990. Korzystne i szkodliwe oddziaływanie mikroflory ryzosferowej na wzrost i rozwój roślin. Post. Mikrobiol. 19 (1-2), 103-123.
- Morris J.G., 1960. Studies on the Metabolism of *Arthrobacter globiformis*. J. Gen. Microbiol. 22, 564-582.
- Muller G., Antheunisse J., 1963. Morphologie, physiologie et ecologie des *Arthrobacter*. Ann. Inst. Pasteur Paris 105, 46-74.
- Pikowska R.J., 1948. Mobilizacja fosfatów w poczwie w swiazi s zizniedziejatielnostju niekotorych vidov mikrobov. Mikrobiologia 5 (17), 362-371.
- Pietr J., 1990. Wpływ saprofitycznej mikroflory ryzosfery na wzrost roślin. Post. Nauk Roln. 3, 19-38.
- Rodziewicz A., Sobieszkański J., 1988. Pozakomórkowe proteinazy drobnoustrojów. Post. Mikrobiol. 27 (1/2), 55-74.
- Rouatt J.W., Katznelson H., 1961. A study of the bacteria on the root surface and in rhizosphere soil of crop plants. J. Appl. Bact. 24, 164-171.
- Różycki H., Strzelczyk E., 1985. Połączenia organiczne wydzielane przez drobnoustroje glebowe i korzenie roślin. Post. Mikrobiol. 14 (4), 285-303.
- Sobczak E., Duszkiewicz W., Grzybowski R., 1978. Teoria i ćwiczenia z mikrobiologii ogólnej i technicznej. Skrypt SGGW-AR w Warszawie.
- Sobiszewski P., 1994. Bakterie jako czynnik biologicznej ochrony roślin przed chorobami. Post. Nauk Roln. 6, 19-33.
- Strzelczyk E., 1988. Biologiczne zwalczanie roślinnych patogenów glebowych. Post. Mikrobiol. 27 (3), 255-272.



**OCCURRENCE OF SOIL BACTERIA OF *Arthrobacter* ssp. GENUS ON WINTER RYE PLANTATION, AND THEIR ENZYMATIC AND ANTAGONISTIC ACTIVITY**

**Abstract.** The aim of the experiment was to analyse bacterial strains of *Arthrobacter* ssp. isolated from rhizosphere, rhizoplane and endorhizoplane of winter rye. The enzymatic and antagonistic activities against phytopathogenic fungi were studied. A high activity of isolated strains in protein, starch, pectins, lecithin hydrolysis was observed. Numerous strains showed a potential for benefiting from organic rather than mineral sources of phosphorus. All the strains examined were catalase positive. Mycoantagonism of *Arthrobacter* ssp. bacteria was investigated towards *Fusarium* genus fungi. The results obtained from microbiological and statistical analyses show that very antagonistic strains of *Arthrobacter* genus bacteria occur in the soil rhizosphere. The correlation analysis shows that protein hydrolysis can be involved in antagonistic mechanisms, and that pectinolytic strains are less effective in growth inhibition of pathogenic fungi.

**Key words:** antagonism, enzymes, *Arthrobacter*, hydrolysis, *Fusarium*

Otrzymano – Received: 05.09.2003

Zaakceptowano – Accepted: 25.11.2003