



Značenje bakteriocina enterokoka u sigurnosti hrane

The significance of enterocins in food safety

Vukušić, N.^{1*}, N. Zdolec²

Sažetak

Značenje enterokoka u području sigurnosti hrane preispituje se već niz godina. S jedne su strane zoni fermentacijske bakterije koje pridonose razvoju senzorskih svojstava fermentirane hrane, sintetiziraju antimikrobne tvari – bakteriocine, no s druge strane stvaraju biogene amine ili prenose gene rezistencije u toj istoj hrani. U ovom su radu prikazane prednosti ovih bakterija s obzirom na sposobnost sinteze bakteriocina enterocina koji pokazuju snažno inhibicijsko djelovanje prema patogenim bakterijama uzročnicima bolesti prenosivih hranom. Primjena enterocina kao prirodnog konzervansa primjer je novih trendova u razvoju biokonzerviranja i proizvodnje mikrobiološki sigurnije hrane životinjskog podrijetla.

¹Nina Vukušić, dr. med. vet.,
Commodatio d.o.o.
²izv. prof. dr. sc. Nevijo Zdolec,
Zavod za higijenu, tehnologiju
i sigurnost hrane, Veterinarski
fakultet Sveučilišta u Zagrebu

*e-mail:
nina.vukusic@commodatio.hr

Abstract

The importance of enterococci in food safety has been discussed for a long time. On the one hand they are fermentative bacteria that contribute to the development of the sensory properties of fermented food, and synthesize antimicrobial agents – bacteriocins, but on the other hand they produce biogenic amines or transfer resistance genes in the same food. This paper presents the advantages of these bacteria with regard to the production of enterocins capable of inhibiting many foodborne pathogens. The use of enterocins as natural preservatives is an example of new trends in the development of bioconservation technologies and the production of microbiologically safer food of animal origin.

UVOD

Bakteriocini su antimikrobni peptidi koje sintetizira većina bakterija, a njihova primjena u hrani ima svrhu produljenja održivosti ili povećanja sigurnosti hrane. S tim u vezi bakterije mlijekočne kiseline najvažnija su mikrobnna skupina u kojoj se pronalaze sojevi koji sintetiziraju bakteriocin i koji se potencijalno mogu koristiti kao zaštitne mikrobne kulture. Brojnim je istraživanjima utvrđen njihov antimikrobni učinak u kontroliranim laboratorijskim uvjetima kao i u proizvodnji različitih vrsta hrane životinjskog podrijetla, posebno fermentirane hrane.

Ključne riječi: enterocini, enterokoki, hrana životinjskog podrijetla, biokonzerviranje, sigurnost hrane

Key words: enterocins, enterococci, food of animal origin, biopreservation, food safety

Bakteriocini enterokoka (enterocini) mogu biti širokog ili uskog spektra djelovanja, no uglavnom inhibiraju gram-pozitivne bakterije. Najvažnije vrste koje proizvode enterocin jesu *Enterococcus faecalis* i *Enterococcus faecium*, a njihovi su bakteriocini iz druge skupine bakteriocina koje smatramo malim, toplinski stabilnim i membranski aktivnim peptidima (Belkum i Stiles, 2000.). Enterocini su opisani kao antimikrobni peptidi aktivni protiv nekih usko povezanih bakterija mlijekočne kiseline, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium* spp., *Staphylococcus aureus* i stoga pokazuju potencijal u unap-

ređenju sigurnosti hrane (Giraffa, 1995.). Mogu se primjenjivati u hrani kao svojevrsni aditivi, tj. dodaci, ili putem sojeva koji sintetiziraju bakteriocin izravno u prehrambenom lancu. Također se ispituje primjenjivost enterokoka kao starter-kultura koje sintetiziraju bakteriocine, no tu je nužna potpuna karakterizacija sojeva s obzirom na potencijalna rizična svojstva (Zdolec i sur., 2017.).

U širem smislu bakteriocini mogu pronaći svoju primjenu i u animalnoj proizvodnji kao svojevrsna zamjena za antibiotike. Naime, danas je zabranjena primjena antibiotika kao promotora rasta, pa se nastoje pronaći određene zamjenske tvari koje bi zamijenile antibiotike, odnosno pridonijele boljoj konverziji hrane i prirastu u tovu (npr. peradi i svinja). Općenito su bolja konverzija i prirast, među ostalim, posljedica supresije štetne mikroflore crijeva. U tom se smislu kao alternativa antibioticima mogu predložiti bakteriocini koji bi se primjenjivali sami ili putem bakterijskih kultura koje će otpuštati bakteriocin u crijevu životinja. Takav pristup ne samo da može pridonijeti zdravlju i produktivnosti životinja, već i smanjenju rizika od širenja patogenih i/ili rezistentnih bakterija u prehrambenom lancu. Naime, pod pretpostavkom da se u crijevu životinja djelovanjem bakteriocina smanji ili spriječi kliconoštvo (npr. *Salmonella*, *Campylobacter*), smije se očekivati i smanjenje pojave tih bakterija u animalnim proizvodima (npr. mlijeko, meso), uz drugu pretpostavku da se uspješno spriječi onečišćenje iz drugih izvora.

Enterokoki u hrani životinjskog podrijetla

Bakterije iz roda *Enterococcus* jesu gram-pozitivni, fakultativno anaerobni koki, koji zbog svoje termostabilnosti i mogućnosti preživljavanja u različitim vremenskim uvjetima nastanjuju (koloniziraju) tlo, vodu i hranu. Poznati su kao komenzali u probavnom traktu ljudi i životinja te imaju ulogu u zrenju i razvoju organoleptičkih svojstava hrane, ali i higijenske ispravnosti proizvoda. Iako je izolirano više od 36 vrsta iz roda enterokoka, njih 26 povezano je s infekcijama u ljudi. *Enterococcus faecalis* i *Enterococcus faecium* dvije su vrste koje posljednjih desetljeća kao oportunistički patogeni uzrokuju

bolničke infekcije urinarnog trakta, bakterijomije, meningitis, neonatalne infekcije i infekcije rana (Hammerum, 2012.; van Tyne i Gilmore, 2014.). U novije vrijeme infekcije povezane biofilmom s medicinskih naprava pripisuju se upravo ovim bakterijama (Arias-Moliz i sur., 2012.).

Enterokoki kao predstavnici bakterija mliječne kiseline imaju važnu ulogu u mikrobiologiji hrane, odnosno biotehnologiji i sigurnosti hrane. Naime, nalazimo ih posvuda u okolišu, probavnom sustavu ljudi i životinja te su se smatrali bakterijama indikatorima onečišćenja hrane. Enterokoki nisu, dakle, nužno pokazatelji fekalne kontaminacije, budući da su ubikvitarni bakterije. Naprimjer, multirezistentni sojevi enterokoka izolirani su iz sirovog mlijeka sakupljenog iz vimena zdravih krava koje nikad nisu bile liječene antibioticima, ali su držane uz liječene životinje (Zdolec i sur., 2016.). To može upućivati na prisutnost rezistentne populacije enterokoka u biosustavu, što je vrlo važno s obzirom na higijenske postupke koji se provode u okviru proizvodnje hrane, a posebice u proizvodnji gotove hrane.

Danas enterokoke smatramo s jedne strane korisnim bakterijama budući da su fermentacijske bakterije koje pridonose senzorskim specifičnostima proizvoda, dok su s druge strane potencijalno virulentne bakterije, tvorci biogenih amina ili nositelji gena rezistencije (Zdolec, 2018.). Stoga su enterokoki bakterije s dvojakom ulogom u proizvodnji hrane, a u hrani životinjskog podrijetla najčešće nalazimo vrste *E. faecalis* i *E. faecium* (Čanžek Majhenič, 2006.). Enterokoki se mogu vrlo lako izolirati iz hrane životinjskog podrijetla, uključujući tradicionalne fermentirane proizvode. Koloniziraju sirovini (meso, mlijeko) preko probavnog sustava ili kontaminiranog okoliša, gdje mogu preživjeti i umnažati se tijekom fermentacije (Hugas i sur., 2003.). S jedne su strane upravo enterokoki ti koji daju posebna organoleptička svojstva domaćim kobasicama i određenim vrstama sira, dok s druge rezistencija na visoku temperaturu (preživljavaju na 62,8 °C 30 min.), sol (6,5 % NaCl) i pH (4,0 – 9,6) (Stiles, 2002.) može dovesti do njihova prekomjernog rasta i uzrokovati kvarenje hrane.

Unatoč dobrim karakteristikama, enterokoki se ne smatraju dobrom, GRAS bakterijama

(engl. *generally recognized as safe*). Mogu stvarati biogene amine ili su prirodno rezistentni na niz antibiotika kao što su cefalosporini, beta-laktami, sulfonamidi i drugi. Najveći je problem stečena rezistencija posredovana genima na plazmidima na kloramfenikol, eritromicin, fluorokinolone i glikopeptide, kao što je vankomicin (antibiotik koji se upotrebljava u terapiji višestrukih rezistentnih infekcija ili kod alergije na penicilin i ampicilin) (Franz i sur., 2003.) kao i prijenos gena rezistencije gdje dolazimo do začaranog kruga prijenosa preko hrane životinjskog podrijetla na probavni trakt ljudi i okoliša (Palmer i Gilmore, 2010.). Tako su izolirani enterokoki rezistentni na antibiotike u mesnim i mlijecnim proizvodima, gotovoj hrani (*ready-to-eat*) te probiotičkim kulturama (Teuber i sur., 1999.; Giraffa i sur., 2000.), dok su enterokoki rezistentni na vankomicin (VRE), posebice *E. faecium*, utvrđeni u goveđem i svinjskom mesu, peradi, mesnim proizvodima (Borgen, 2001.; Lemcke i Bülte, 2000.), industriji sira i tradicionalnim siranama (Teuber i sur., 1999.). Osim posjedovanja virulentnih gena i gena rezistencije, *E. faecalis* ima sposobnost horizontalnog širenja tih gena, dok je u posljednjem desetljeću zabilježen prijenos gena rezistencije na antibiotike između sojeva *E. faecium*, kao i prijenos rezistencije na vankomicin s *E. faecalis* na *S. aureus* (Palmer i Gilmore, 2010.).

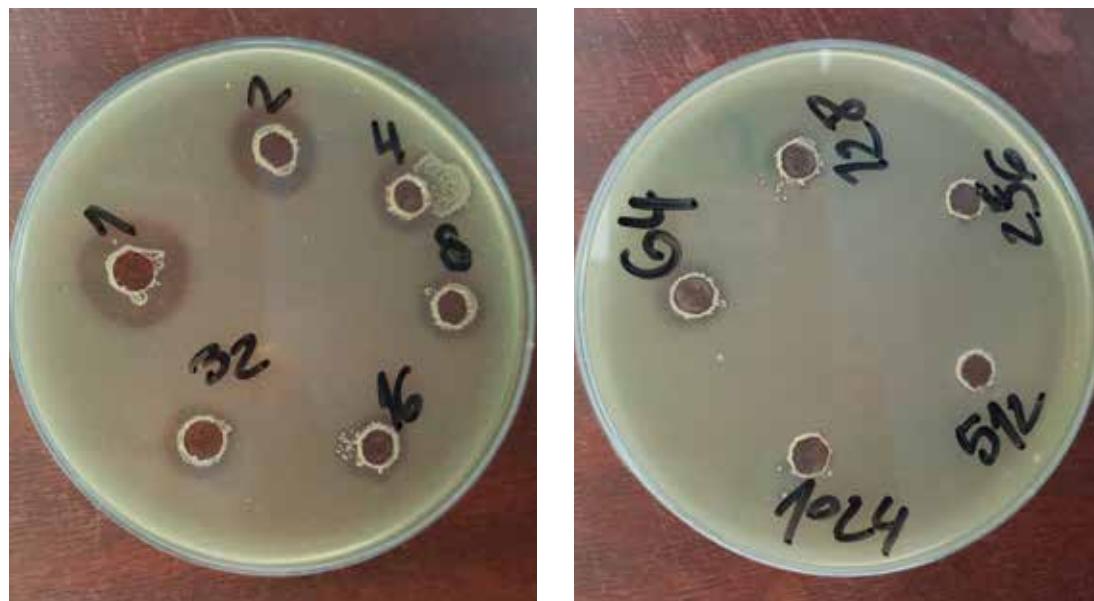
Bakteriocini

Posljednjih dvadeset godina istraživanja o bakteriocinima gram-pozitivnih bakterija u velikom su porastu, s posebnim fokusom na bakterije mlijecne kiseline (BMK), i zbog temeljnih istraživanja i zbog njihove moguće primjene u prehrabenoj industriji i sprečavanju alimentarnih infekcija (Mirković, 2016.). Bakteriocini su uglavnom mali, termolabilni, pozitivno nabijeni peptidi koji svoje djelovanje pokazuju povećanjem membranske propusnosti što za posljedicu ima gubitak metabolita iz bakterijske stanice. Smatra se da njihova raznovrsnost u veličini, antimikrobnom spektru i mehanizmu djelovanja omogućuje bakteriji koja ga proizvodi ekološku prednost i opstanak u okruženju koje dijeli s blisko srodnim vrstama s kojima su u kompeticiji za iste nutrijente. Općenito, različiti bakteriocini variraju u spektru i načinu an-

timikrobnog djelovanja, molekularnoj masi, genetskim i biokemijskim svojstvima (Jack i sur., 1995.). Njihovo je ciljno mjesto citoplazmatska membrana u kojoj stvaraju pore kroz koje se gubi stanični materijal. S druge strane učinak hidrofobnih bakteriocina na gram-negativne bakterije onemogućen je strukturom njihove stanične stijenke (Helander i sur. 1997.). Stoga bakteriocini bakterija mlijecne kiseline mogu biti aktivni samo protiv srodnih gram-pozitivnih bakterija (Jack i sur., 1995.). Svoje antimikrobitno svojstvo oni pokazuju putem dva mehanizma: a) vezanjem bakteriocina za specifične receptore na vanjskoj staničnoj membrani što povećava propusnost ionskih kanala i gubitak intracelularnih elektrolita i/ili pH ravnoteže i b) prolaskom bakteriocina kroz citoplazmatsku membranu indukcijom aktivnih nukleaza. Poznato je da bakteriocini BMK djeluju na gram-pozitivne bakterije, dok djelovanje na gram-negativne nije uobičajeno, najvjerojatnije zbog složenije strukture njihove stanične membrane koja je nepropusna za većinu makromolekula i hidrofobnih supstancija (Vesković-Moračanin, 2010.).

Bakteriocini enterokoka – enterocini

Kako smo već naveli, enterocini su bakteriocini koje proizvode bakterije iz roda *Enterococcus*, kao što su *E. faecalis*, *E. faecum*, *E. durans* i *E. mundii*. Mnogi od tih enterocina pokazali su snažan baktericidni učinak prema bakterijama kvarenja ili patogenim mikroorganizmima prisutnim u hrani, npr. *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium sp.*, *E. coli*, *Vibrio cholerae* i *Bacillus cereus*, te zbog toga imaju važnu ulogu kao prirodni konzervansi (Giraffa i sur., 1997.). U našem nedavnom istraživanju (Vukušić i Zdolec, 2019.; u tisku) pokazalo se da enterokoki djeluju inhibicijski na sojeve bakterija *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* i *L. innocuata* *Y. enterocolitica*. Antimikrobitno djelovanje na bakterije roda *Listeria* zabilježeno je i nakon neutraliziranja nadataloga kulture *E. faecalis* EF-101, što može biti rezultat djelovanja bakteriocina – enterocina (slika 1). Proteinska struktura inhibitora potvrđena je primjenom proteinaze K, što se smatra dokazom postojanja bakteriocina u otopini (nadatalogu).



Slika 1. Inhibicija rasta *L. monocytogenes* primjenom neutraliziranog nadtaloga kulture *E. faecalis* EF-101 (snimila: Nina Vukušić)

Crk i Zdolec (2018.) navode da *Enterococcus faecalis* 101 pokazuje u agar-spot i agar-difuzijskim testovima inhibicijsko djelovanje prema referentnom soju *L. monocytogenes* te prema šest izolata *L. monocytogenes* iz uzoraka hrane životinjskog podrijetla. Autori su istodobnom inokulacijom *E. faecalis* 101 i *L. monocytogenes* ATCC 7644 u BHI/MRS bujonima dokazali evidentno smanjenje populacije patogena u odnosu na bujone bez *E. faecalis*. Osim toga primjena nadtaloga (neutraliziran nadtalog bez stanica) dovela je do još izraženijeg smanjenja broja *L. monocytogenes* u oba tekuća hranilišta.

Primjena enterocina u prehrambenoj industriji

Proces obrade i prerade, posebno mesnih proizvoda, u današnjoj industrijskoj proizvodnji hrane uključuje brojne kemijske procese. U posljednje je vrijeme zdravstvena svijest javnosti dovela do povećane potražnje proizvoda koji zaobilaze te procese, stoga upotreba bakteriocina nije samo prednost za same bakterije nego se može iskoristiti u prehrambenoj industriji kao sredstvo za kontrolu nepoželjnih mikroorganizama u namirnicama, i to na prirodan način, što je na kraju i osnovni zahtjev samih potrošača.

Da bi se razmatrali kao potencijalne starter, zaštitne ili probiotičke kulture, mikroorganizmi moraju zadovoljiti kriterije sigurnosti poput izostanka virulentnih faktora, prenosivih gena

rezistencije ili dekarboksilacijske aktivnosti (Zdolec, 2018.). Pojedini sojevi *E. faecalis* i *E. faecium* ne pokazuju virulentna svojstva, ne tvore biogene amine niti su otporni na antibiotike, pa ih to čini potencijalno primjenjivima u fermentiranim proizvodima. Zabilježeno je da enterekoki tijekom fermentacije snažno inhibiraju rast *Listeria* sp., ne uzrokuju promjenu kvalitete okusa te ih autorи preporučuju kao starter-kulture mesnim proizvodima kako bi se poboljšala sigurnost hrane. Tako su *E. faecium* RZS C13 i *E. faecium* CCM 4231 korišteni kao starter-kulture u proizvodnji španjolskih kobasica (Callewaert i sur., 2000.). Ananou i suradnici (2004.) upotrijebili su enterocin AS-48 iz *E. faecalis* za kontrolu enterotoksičnih sojeva *S. aureus*. Autori su kombinirali metode čuvanja hrane i dodali enterocin na 4 °C, zajedno s povećanom koncentracijom NaCl (6 – 7 %) i time dobili željene rezultate. Ennahar i Deschamps (2000.) zapazili su visoku aktivnost entoricina A iz *E. faecium* na 13 sojeva *L. monocytogenes*. Aymerich i suradnici (2000.) demonstrirali su učinkovitost enterocina A i B u smanjivanju populacije *L. innocua* u raznim mesnim proizvodima (kuhana šunka, pašteta, fermentirani proizvodi).

Unatoč intenzivnom proučavanju bakteriocina kao biokonzervansa u hrani, samo se nizin i pediocin AcH/PA1 upotrebljavaju komercijalno kao prirodni konzervansi hrane u zemljama širom svijeta. Relativno uski spektri djelovanja

mnogih bakteriocina, stalne promjene zakonskih regulativa za korištenje dodataka u prehrabenoj industriji i brza adaptacija patogenih bakterija na bakteriocine koji se dodaju najčešći su razlozi njihove ograničene upotrebe. Zbog toga su istraživanja sve više usmjerena k stvaranju mutantnih sojeva koji će proizvoditi dva ili više bakteriocina istodobno (Martinez i sur., 2000.; Horn i sur., 1999.). No kako je upotreba rekombinantnih mutanata u prehrabenoj industriji ograničena, prirodni su izolati i daje najveći izvor novih bakteriocina sa širokim spektrom djelovanja.

Napomena: Rad je izvadak iz diplomskog rada Nine Vukušić *Karakterizacija bakteriocina enterokaka izoliranih iz hrane životinjskog podrijetla* (mentor izv. prof. dr. sc. Nevijo Zdolec)

LITERATURA

- ANANOU, S., E. VALDIVIA, M. MARTINEZ BUE-NO, A. GALVEZ, M. MAQUEDA (2004): Effect of combined physico-chemical preservatives on enterocin AS-48 activity against the enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* CECT 976 strain. *J. Appl. Microbiol.* 97, 48-56.
- ARIAS-MOLIZ, M. T., P. BACA, S. ORDONEZ-BECERRA, M. P. GONZALEZ-RODRIGUEZ, C. M. FERRER-LUQUE (2012): Eradication of enterococci biofilms by lactic acid alone and combined with chlorhexidine and cetrimide. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal*, 17, e902-e906. doi: 10.4317/medoral.18133.
- AYMERICH, T., M. GARRIGA, J. YLLA, J. VALLIER, J. M. MONFORT, M. HUGAS (2000): Application of enterocins as biopreservatives against *Listeria innocua* in meat products. *J. Food Protect.* 63, 721-726.
- BELKUM, M. J., M. E. STILES (2000): Nonantibiotic antibacterial peptides from lactic acid bacteria. *Nat. Prod. Rep.* 17, 323-335.
- BORGEN, K., M. SORUM, J. WASTESON, H. KRUSE (2001): VanA-type vancomycin-resistant enterococci (VRE) remain prevalent in poultry carcasses 3 years after avoparcin was banned. *Int. J. Food Microbiol.* 64, 89-94.
- CALLEWAERT, R., M. HUGAS, L. DE VUYST (2000): Competitiveness and bacteriocin production of enterococci in production of Spanish style dry fermented sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 57, 33-42.
- CRK, D., N. ZDOLEC (2018): Antimicrobial potential of enterococci isolated from raw milk. *Hrvatski veterinarski vjesnik*, 26, 30-34.
- ČANŽEK MAJHENIĆ, A. (2006): Enterococci: yin-yang microbes. *Mljekarstvo*, 56, 1, 5-20.
- ENNAHAR, S., N. DESCHAMPS (2000): Anti-*Listeria* effect of enterocin A, produced by cheese isolated *Enterococcus faecium* EFM01, relative to other bacteriocins from lactic acid bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 88, 449-457.
- FRANZ, C. M. A. P., M. E. STILES, K. H. SCHLEIFER, W. H. HOLZAPFEL (2003): Enterococci in foods-a conundrum for food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 88, 105-122.
- GIRAFFA, G. (1995): Enterococcal bacteriocins their potential as anti-*Listeria* factors in dairy technology. *Food Microbiol.* 12, 291-299.
- GIRAFFA, G., D. CARMINATI, E. NEVIANI (1997): Enterococci isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use. *J. Food Prot.* 60, 732-738.
- GIRAFFA, G., A. M. OLIVARI, E. NEVIANI (2000): Isolation of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from Italian cheeses. *Food Microbiol.* 17, 671-677.
- HAMMERUM, A. M. (2012): Enterococci of animal origin and their significance for public health. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 7, 619-625.
- HELANDER, I., A. VON WRIGHT, T. MATTILA-SANDHOLM (1997): Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against gram-negative bacteria. *Trends Food Sci. Tech.* 8, 146-150.
- HORN, N., M. I. MARTINEZ, J. M., MARTINEZ, P. E. HERNANDEZ, M. J. GASSON, J. M. RODRIGUEZ, H. M. DODD (1999): Enhanced production of pediocin PA-1 and coproduction of nisin and pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4443-4450.
- HUGAS, M., M. GARRIGA, M. T. AYMERICH (2003): Functionality of enterococci in meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 88, 223-233.
- JACK, R. W., J. R. TAGG, B. RAY (1995): Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* 59, 171-200.

- LEMCKE, R., M. BÜLTE (2000): Occurrence of the vancomycin-resistant genes vanA, vanB, vanC1, vanC2 and vanC3 in Enterococcus strains isolated from poultry and pork. Int. J. Food Microbiol. 60, 185-194.
- MARTINEZ, J. M., J. KOK, J. W. SANDERS, P. E. HERNANDEZ (2000): Heterologous coproduction of enterocin A and pediocin PA-1 by Lactococcus lactis: detection by specific peptide-directed antibodies. Appl. Environ. Microbiol. 66, 3543-3549.
- MIRKOVIĆ, N. L. (2016): Karakterizacija i determinacija bakteriocina autohtonih laktokaka. Disertacija. Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu. Beograd, Srbija.
- PALMER, K. L., M. S. GILMORE (2010): Multi-drug-Resistant Enterococci Lack CRISPR-cas. MBio 1, e00227-10.
- STILES, M. (2002): Safety aspects of enterococci from food point of view. Symposium on Enterococci in Foods-Functional and Safety aspects, 30-31 May. Berlin, Njemačka. str. 23.
- TEUBER, M., L. MEILE, F. SCHWARZ (1999): Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. Antoine van Leeuwenhoek, 76, 115-137.
- VESKOVIĆ-MORAČANIN, S. (2010): Lactic acid bacteria bacteriocins as natural food protec-tors - possibilities of applications in food industry. Tehnologija mesa. 51, 83-94.
- VAN TYNE, D., M. S. GILMORE (2014): Friend turned foe: evolution of enterococcal virulence and antibiotic resistance. Annu. Rev. Microbiol. 68, 337-356.
- VUKUŠIĆ, N., N. ZDOLEC (2019): Utjecaj bakteriocina enterokoka na odabrane uzročnike bolesti prenosivih hranom. Vet. stn. 50. U tisku.
- ZDOLEC, N., V. DOBRANIĆ, I. BUTKOVIC, A. KOTURIĆ, I. FILIPOVIĆ, V. MEDVID (2016): Antimicrobial susceptibility of milk bacteria from healthy and drugtreated cow udder. Vet. arhiv, 86, 163-172.
- ZDOLEC, N., M. ČOP, V. DOBRANIĆ (2017): Primjena *Enterococcus faecalis* 101 iz mlijeka u proizvodnji trajnih kobasicu. Hrvatski veterinarski vjesnik 25, 1-2, 56-62.
- ZDOLEC, N. (2018): Technological interventions in fermented meat production: the commercial perspective. U: Innovations in technologies for fermented food and beverage industries, Food Microbiology and Food Safety. (Panda, S.K., P.H. Shetty, Ur.). Springer International Publishing AG, Cham, str. 175-188.

XIX International Congress of ISAH



ISAH
2019

September 8th - 12th 2019 - Wrocław, POLAND