

Aplicación de la proteína verde fluorescente en el monitoreo de cepas degradadoras de fenol

Application of green fluorescent protein for monitoring phenol-degrading strains

Ana Milena Valderrama F., Julia Raquel Acero R. *

RESUMEN

Diversos métodos se han descrito para monitorear microorganismos en muestras ambientales; recientemente se han diseñado sistemas para la marcación estable de cepas con genes testigos como los genes *lux* (luminiscencia) y el gen de la proteína verde fluorescente (GFP). Este estudio presenta la marcación de una cepa degradadora de fenol con el gen *gfp*, su evaluación y monitoreo en un biorreactor con agua agria de refinería. Se obtuvieron cepas recombinantes con las mismas características fisiológicas y metabólicas a su cepa parental. La expresión de la fluorescencia se mantuvo estable sin selección por más de 50 generaciones sucesivas, y las cepas marcadas fueron recuperadas del biorreactor después de 45 días de tratamiento para la degradación de fenol.

Palabras clave: GFP, aguas residuales industriales, biorremediación, biosensor.

ABSTRACT

Several methods have been developed for detecting microorganisms in environmental samples. Some systems for incorporating reporter genes, such as *lux* or the green fluorescent protein (GFP) gene, have been developed recently. This study describes *gfp* gene marking of a phenol degrading strain, its evaluation and monitoring in a bioreactor containing refinery sour water. Tagged strains were obtained having the same physiological and metabolic characteristics as the parent strain. Fluorescent expression was kept stable with no selection for more than 50 consecutive generations and tagged strains were recovered from the bioreactor after forty-five days of phenol-degradation treatment.

Key words: GFP, industrial wastewater, bioremediation, biosensor.

INTRODUCCIÓN

Teniendo como marco las políticas de protección y recuperación del ambiente de la Empresa Colombiana de Petróleos (Ecopetrol), se cuenta con tecnologías para reducir el impacto ambiental que ocasiona el vertimiento de efluentes generados en los diferentes procesos de refinería. El agua agria y sodas gastadas son las corrientes de agua que aportan la mayor parte del fenol (aproximadamente el 90%) a las plantas de tratamiento de aguas residuales de refinерías. En el tratamiento integral de aguas de refinería se emplea la degradación biológica del fenol, y actualmente se está evaluando

el uso de sistemas inmovilizados para su optimización (Díaz *et al.*, 2001).

Tradicionalmente la cuantificación de microorganismos en procesos de biorremediación se realiza a través de la determinación del número de células viables en placa, el número más probable o perconteo directo al microscopio; métodos que a pesar de su amplio uso tienen limitantes en la diferenciación de la población nativa a la bioaumentada y en la recuperación de microorganismos metabólicamente activos pero no cultivables (Amann *et al.*, 2001;

* Ecopetrol. Instituto Colombiano del Petróleo. Laboratorio de Biotecnología. A.A 4185-Bucaramanga-Colombia. E-mail: jacero@ecopetrol.com.co; anamilenav@ecopetrol.com.co

Ranjard *et al.*, 2000). Así mismo, técnicas moleculares como PCR, RFLP, el uso y análisis de sondas del ADNr 16S y la diferenciación poblacional con DGGE/TGGE han sido ampliamente utilizadas para determinar la viabilidad y distribución geográfica de diferentes poblaciones microbianas (Selvaratnam *et al.*, 1997; Muyzer *et al.*, 1999; Kozdrój & Elsas, 2001).

Una nueva alternativa para el monitoreo y estudio de la población microbiana es la marcación de microorganismos por métodos moleculares a través de la incorporación de genes testigos como la proteína verde fluorescente (GFP) de *Aequorea victoria* (Prasher, 1992). La GFP ha sido expresada con éxito en diferentes organismos procariontes y eucariontes y sus aplicaciones son numerosas (Lorang *et al.*, 2001); entre ellas, el estudio de promotores y secuencias reguladoras, el análisis de proteínas recombinantes y monitoreo de bioprocesos (Poppenborg *et al.*, 1997; Sarand *et al.*, 2001). Este sistema presenta ventajas sobre sistemas testigos como el operón *lux* y *lacZ*. Debido a que no requiere la adición de cofactores o sustratos, es fácilmente detectada por microscopía o espectrofotometría de fluorescencia (Verma, 1996).

Recientemente se han desarrollado vectores para la integración estable del gen *gfp* en el cromosoma bacteriano, que se fundamentan en la expresión del gen bajo la acción de promotores constitutivos o inducibles (Dandie *et al.*, 2001). Estos sistemas son útiles en el estudio de la supervivencia, actividad y distribución geográfica de microorganismos nativos o modificados genéticamente (GEMS) en procesos de biorremediación de suelos o aguas residuales industriales.

Este trabajo presenta la aplicación del sistema GFP en la marcación y monitoreo de microorganismos degradadores de fenol en aguas residuales de la industria del petróleo. El efecto y la estabilidad de la marcación fueron determinados al nivel de laboratorio, y la viabilidad y capacidad de degradación fueron monitoreadas *in situ* por un período de 45 días. Se plantea la construcción de un biosensor para fenol empleando el sistema de la GFP.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos, plásmidos y condiciones de cultivo

El consorcio bacteriano degradador de fenol fue aislado de la planta de tratamiento de aguas residuales de la Gerencia Complejo Barrancabermeja (GCB) y está conformado por las cepas ICP 244 *Pseudomonas aeruginosa*, ICP 245 *P. putida* Biotipo B e ICP 246 *P. putida* Biotipo B. El consorcio fue identificado utilizando el sistema Biolog® Versión 4.0 (Berdugo *et al.*, 2001). Las cepas donadoras del gen *gfp* corresponden a los microorganismos ICP 280 *Escherichia coli* S17.1 *Apir/pUTminiTn5ngfp* (promotor constitutivo) e ICP 281 *E. coli* S17.1 λ pir/pUTminiTn5ngfp (*promoterless*) gentilmente cedidas por la doctora Cathy Dandie de la Universidad de Flinders. Las cepas de *Pseudomonas* fueron cultivadas en medio basal de sales (MBS) (NaCl 0,3; (NH₄)₂SO₄ 0,6; K₂HPO₄ 0,75; KH₂PO₄ 0,25; MgSO₄ 0,15; KNO₃ 0,6 g/L) suplementado con 200 mg/L de fenol como fuente de carbono. Los recombinantes fueron cultivados en agar LB (Tryptona 10; NaCl 10; extracto de levadura 5, agar 18 g/L) y/o agar cetrímide (Merck®) con la adición de antibióticos, para *E. coli* ampicilina (Ap 50 µg/ml) y tetraciclina (Tc 10 µg/ml) y para *Pseudomonas* tetraciclina (Tc 20 µg/ml).

Conjugación, selección y caracterización de cepas recombinantes

La conjugación entre las cepas de *E. coli* donadoras del gen *gfp* y la cepa ICP 245 se realizó mediante el método de entrecruzamiento en placa descrito por Matthysse *et al.* (1996). A partir de un inóculo fresco (18 horas) de la cepa donadora y otro de la receptora, se centrifugó independientemente 1 ml del cultivo, se lavó dos veces con caldo LB y el pellet celular se suspendió en 100 µl de LB. Se mezclaron volúmenes iguales de las dos cepas y se sembraron 100 µl de la mezcla en agar LB; se incubó a 32°C durante 24 horas y se recogieron las células del agar en 2 ml de agua estéril. Finalmente se sembraron diluciones seriadas del producto del entrecruzamiento en el medio selectivo y se incubó a 32°C durante 24 horas. La expresión de la GFP se verificó con la observación de las células en el microscopio de fluorescencia usando el set de filtros 12 (Ploemopak®) con un filtro excitador (banda de pasaje 450-490 nm) y un filtro de emisión (banda de pasaje de ancha 515 nm). La estabilidad del gen

introducido se evaluó para 6 cepas recombinantes durante 50 generaciones en caldo LB con y sin la presión selectiva del antibiótico verificando al microscopio la emisión de fluorescencia.

Inmovilización y monitoreo del biorreactor con cepa recombinante

La actividad degradadora de fenol se evaluó para dos cepas recombinantes en erlenmeyer (500 ml) con 200 ml de MBS más 200 mg/L de fenol, agitación constante (130 rpm) y temperatura constante (32°C). Se determinó la concentración de fenol con el método de la 4-aminoantipirina (ASTM D1583-91) después de 13 horas de incubación. La inmovilización del consorcio degradador de fenol (ICP 244, ICP 245-GFP, ICP 246) se realizó sobre láminas de PVC dispuestas en un biorreactor en columna de vidrio con burbujeo de aire y temperatura constante de 32°C. El volumen efectivo del reactor fue 1200 ml, y progresivamente se realizó la adaptación del consorcio al efluente de refinería de la GCB (agua agria) que contiene fenol en concentraciones cercanas a 300 g/L. Después de 45 días de adaptación al agua agria se cuantificó la población inmovilizada por el recuento en MBS + fenol y agar cetrímide (Tc 20) y se observó al microscopio la emisión de fluorescencia de la población recuperada en el medio selectivo con tetraciclina. Se evaluó la actividad degradadora de fenol del consorcio inmovilizado, con la determinación de fenol mediante el método de la 4-aminoantipirina en un cultivo en lote con un tiempo de operación de 24 horas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Conjugación, selección y caracterización de cepas recombinantes

En este estudio se realizó la conjugación de la cepa degradadora de fenol ICP 245 y cepas de *E. coli* S17.1 λ pir que contienen los vectores *gfp*, uno bajo el control del promotor constitutivo *npt2* y otro bajo el sistema *promoter-less* (figura 1). En cada conjugación se obtuvieron recombinantes de los cuales se seleccionaron 20 de cada tipo para evaluar la expresión de fluorescencia. Para la selección de las cepas recombinantes de *Pseudomonas putida* fue necesario hallar la concentración mínima inhibitoria (MIC) de los antibióticos de selección para la cepa ICP 245 nativa. Se logró comprobar la resistencia a la ampicilina y

una MIC de tetraciclina igual a 10 μ g/ml. Por tanto, la selección de recombinantes se realizó en agar LB y cetrímide con 20 μ g/ml de tetraciclina. El número de recombinantes obtenido con el promotor constitutivo fue 89×10^3 ufc/ml, y para el sistema *promoter-less* se recuperaron 20×10^2 ufc/ml. Para favorecer el número de recombinantes por entrecruzamiento se puede utilizar la combinación de diferentes proporciones de cepa donadora:receptora; sin embargo, como en este caso, utilizando una relación 1:1 se obtuvieron recombinantes entre los órdenes de 10^2 y 10^3 ufc/ml para su evaluación por emisión de fluorescencia.

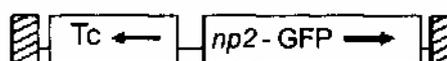


Figura 1. Construcción del vector pUTminiTn5ngfp (promotor constitutivo); el vector pUTminiTn5gfp (*promoter-less*) tiene el gen testigo *gfp* en remplazo del *npt2-gfp* (Dandie *et al.*, 2001).

Los recombinantes seleccionados fueron evaluados en el microscopio de fluorescencia para verificar la expresión de la proteína fluorescente (figura 2). Con el sistema constitutivo *ngfp* la intensidad de la fluorescencia fue similar entre los diferentes recombinantes. En contraste, con el sistema *promoter-less* se observaron diferencias en la intensidad de la fluorescencia, desde altamente fluorescentes hasta no fluorescentes. El rango de fluorescencia observado en los recombinantes *gfp promoter-less* es dependiente de la inserción del transposón detrás de diferentes promotores en el cromosoma de la bacteria receptora (Dandie *et al.*, 2001). Se destacó la alta intensidad en la fluorescencia para el recombinante GFP₁₁ (*promoter-less*) la emisión de fluorescencia de esta clase de recombinante indica que la inserción del gen se realizó *downstream* de un promotor fuerte. De esta forma, el uso del sistema *promoter-less* ofrece la posibilidad de hallar recombinantes que puedan ser inducidos por la exposición del microorganismo a condiciones adversas como altas temperaturas, baja disponibilidad de nutrientes la respuesta a sustancias tóxicas en el ambiente, parámetros importantes en el control de procesos de biorremediación y en el desarrollo de biosensores para el control de calidad de vertimientos de agua.



Figura 2. Microfotografía de fluorescencia ICP 245 *P. putida* marcada con GFP (1000x).

Estabilidad de la marcación molecular

Con el fin de establecer la estabilidad de la marcación con el gen *gfp* en el cromosoma bacteriano, se evaluaron 50 generaciones sucesivas para seis recombinantes con el promotor constitutivo. El fenotipo fluorescente se logró mantener estable para el 100% de los recombinantes con y sin la presión del antibiótico. Sin embargo, se observaron diferencias en el nivel de fluorescencia, siendo ligeramente menor la intensidad para las cultivadas en condiciones no selectivas. A pesar de la disminución en la fluorescencia, la expresión de la GFP para la cepa ICP 245 se mantiene estable sin la presión selectiva del antibiótico, parámetro importante para su monitoreo *in situ* en aguas industriales. Resultados similares en la estabilidad del transposón han sido demostrados para *P. aeruginosa* donde se observó la estabilidad del gen marcador por la emisión de fluorescencia hasta diez días de subcultivo sin la presión selectiva del antibiótico (Dandief *et al.*, 2001).

Actividad metabólica de cepas marcadas con GFP

Una vez evaluada la estabilidad en la marcación, se procedió a determinar el efecto de la inserción del transposón en la capacidad de degradación de fenol de la cepa ICP 245 *P. putida*. En la figura 3 se observan los resultados obtenidos en la degradación de fenol después de 13 horas de tratamiento usando MBS + 200 ppm de fenol. Se encuentra un comportamiento similar entre la cepa nativa y las cepas recombinantes marcadas con GFP con porcentajes de degradación de 99,9% en condiciones de laboratorio. La concentración de fenol en el control negativo se mantuvo estable, indicando que el proceso de oxidación de este

compuesto es sólo de tipo biológico. Estos resultados demuestran que la inserción del gen *gfp* no modifica la expresión del operón que codifica para las enzimas involucradas en la degradación de fenol. De manera similar, otros autores han demostrado el mantenimiento en la actividad metabólica de cepas transformadas con el sistema GFP. Dandief *et al.* (2001) verificó el mantenimiento en la utilización de diesel como única fuente de carbono de cepas de *P. aeruginosa* que contienen el gen *gfp* con el sistema transposón. De otra forma se han comparado parámetros fisiológicos de *P. fluorescens* transformadas y no transformadas con el gen *gfp* en sistemas plasmídicos, que han permitido establecer la estabilidad en la tasa de crecimiento en condiciones de laboratorio (Bloenbergh *et al.*, 1997).

La emisión de fluorescencia en MBS más fenol se mantiene, aunque se dificulta su observación directa al microscopio por el tamaño de las células. El tamaño celular es menor, ya que en el MBS más fenol no se cuenta con la disponibilidad de nutrientes del medio enriquecido. Observaciones semejantes se presentaron en el cambio de la morfología celular de especies de *Pseudomonas* extraídas de la rizósfera con el predominio de células pequeñas y cocoides (Normander *et al.*, 1999).

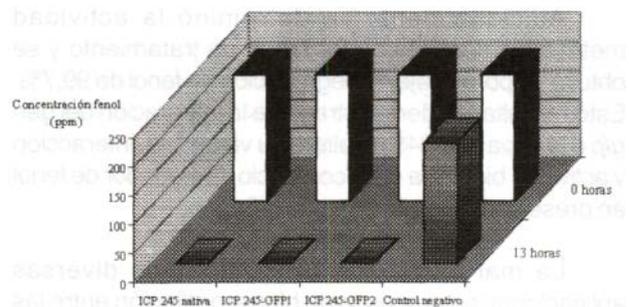


Figura 3. Actividad degradadora de fenol de la cepa ICP 245 *P. putida* nativa y cepas recombinantes marcadas con la proteína verde fluorescente (GFP).

Inmovilización y monitoreo de biorreactor con cepa recombinante

Con el objetivo de observar el comportamiento de la cepa recombinante se evaluó su inmovilización y actividad degradadora de fenol en una matriz de efluente de refinería como el agua agria. Se inmovilizó

la cepa marcada ICP 245 (GFP..) junto con los otros dos microorganismos que conforman el consorcio degradador de fenol. Como soporte de inmovilización se utilizaron láminas de PVC dispuestas verticalmente en una columna de vidrio, este soporte fue previamente evaluado y seleccionado en el estudio para el tratamiento de aguas residuales (Díaz *et al.*, 2001). El consorcio fue adaptado al agua agria que químicamente se caracteriza por tener concentraciones de fenol entre 200 a 300 ppm, junto con concentraciones apreciables de otros compuestos como nitrógeno amoniacal, sulfuros y mercaptanos entre otros. Después de 45 días de inmovilización del consorcio, se calculó la población libre e inmovilizada al soporte, se observó la permanencia de la cepa marcada con GFP tanto en la población libre como en la inmovilizada (figura 4). En los recuentos del MBS se diferenciaron las tres colonias características del consorcio degradador de fenol, y por el recuento en el medio selectivo (agar cetrimide + Tc) se detecta que aproximadamente el 56% de la población libre corresponde a la cepa marcada, mientras que el 76% de la población inmovilizada corresponde a la cepa con el gen *gfp*. Los microorganismos aislados del medio selectivo mantuvieron su fenotipo fluorescente; sin embargo, la observación de fluorescencia directamente del agua agria se dificultó debido a la morfología propia de la bacteria en esta matriz.

Adicionalmente se determinó la actividad metabólica después de 24 horas de tratamiento y se obtuvo un porcentaje de degradación de fenol de 99,7%. Estos resultados demuestran que la integración del gen *gfp* a la cepa ICP 245 no alteró su viabilidad, interacción y actividad biológica en el consorcio degradador de fenol en presencia de agua agria de refinería.

La marcación con GFP ha tenido diversas aplicaciones en procesos de biorremediación entre las cuales se destacan el monitoreo de cepas de *P. aeruginosa* degradadoras de diesel (Dandie *et al.*, 2001) y la detección en suelo de células de *Alcaligenes faecalis* degradadoras de fenol (Bastos *et al.*, 2001). Así mismo, el uso de vectores *gfp* ha sido utilizado para determinar la viabilidad y actividad en la rizósfera de cepas de *P. fluorescens* que intervienen en la colonización de raíces en diferentes plantas (Bloenmberg *et al.*, 1997; Normander *et al.*, 1999).

De esta manera el uso de microorganismos marcados con GFP puede dar información adicional

sobre la eficacia en la aplicación de inoculantes en procesos de biorremediación donde su viabilidad y actividad pueden estar determinadas por la competencia con la microflora nativa (Dandie *et al.*, 2001). La población nativa del agua agria se encuentra en el orden de 10^2 ufc/ml, y en este caso se observó que la población predominante en el soporte es la población bioaumentada, específicamente con la recuperación de la cepa marcada-GFP en un 76% sobre la población total.

Así mismo, este sistema ofrece la posibilidad de desarrollar biosensores para la detección y cuantificación de contaminantes ambientales. La construcción de un biosensor para fenol requiere la clonación del gen *gfp downstream* del promotor y región reguladora de los genes degradadores de fenol, de tal manera que la cantidad de fluorescencia emitida sea proporcional a la concentración de fenol presente en la matriz. Estudios anteriores demostraron que la cepa ICP 245 sigue la ruta del *meta*-clivaje del fenol asociada a la regulación del operón *dmp* (Valderrama *et al.*, 1999). Este operón ha sido ampliamente estudiado en la cepa *Pseudomonas sp.* CF 600 donde se conoce la región promotora, y se están identificando los mecanismos de regulación de este sistema (Sarand *et al.*, 2001). Esta información permite diseñar la estrategia para la construcción de un biosensor para fenol con la cepa ICP 245 y utilizarlo en línea como indicador de la calidad de agua y eficacia del tratamiento de biodegradación.

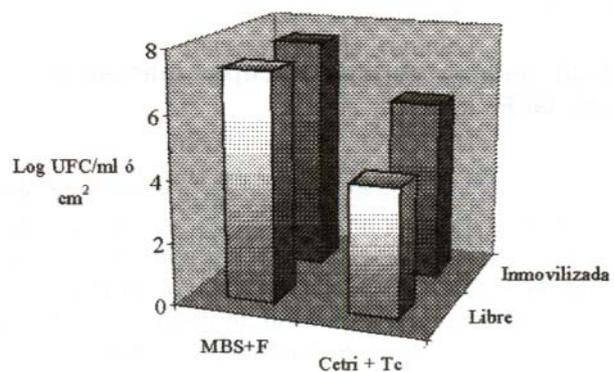


Figura 4. Recuento de población microbiana en biorreactor inmovilizado con consorcio bacteriano degradador de fenol marcado con la GFP. (UFC: unidades formadoras de colonia por mililitro para la población libre o por cm^2 para la población inmovilizada; MBS+F medio basal de sales + fenol; Cetri+Tc Agar cetrimide + tetraciclina).

CONCLUSIONES

El sistema de marcación con la proteína verde fluorescente (GFP) constituye una alternativa útil en el monitoreo de microorganismos en ambientes complejos como en el proceso de tratamiento de aguas agrias de refinería.

Las cepas recombinantes marcadas con la GFP presentaron una alta estabilidad en la emisión de fluorescencia sin alterar sus principales características fisiológicas y capacidad de degradación de fenol.

El reactor bioaumentado con el consorcio degradador de fenol (ICP244, ICP245-GFP₁, ICP246) mostró la misma eficacia en la actividad metabólica al consorcio nativo, y se verificó la permanencia de la cepa marcada GFP en el soporte de inmovilización después de 45 días de operación.

AGRADECIMIENTOS

A la doctora Cathy Dandie de la Universidad de Flinders (Australia) por el suministro de los vectores con el gen *gfp*.

REFERENCIAS

- Amann, R., Fuchs, B., Behrens, S. 2001. The identificaron of microorganisms by fluorescence in situ hybridization. *Current Opinión in Biotechnology*. 12:231-236.
- Bastos, A. E. R., Cassidy, M. B., Trevors, J. T., Lee, H., Rossi, A. 2001. Introduction of a green fluorescent protein gene into phenoldegrading *Alcaligenes faecalis* cells and their monitoring in phenol-contaminated soil. *Appl. Microbiol. Biotech.* 56:255-260.
- Verdugo, C., Ardua, M., Dugarte, F., Torres, E. 2001. II Informe trimestral "Tratamiento de sulfuro, fenol y nitrógeno amoniacal en efluentes de refinería". Laboratorio de Biotecnología. División de Tecnologías Complementarias. Instituto Colombiano del Petróleo.
- Bloenmberg, G. V., OToole, G. A., Lugtenberg, B. J. J., Kolter, R. 1997. Green fluorescent protein as a marker for *Pseudomonas* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(11):4543-4551.
- Dandie, C. E., Thomas, S.M., McClure, N.C. 2001. Comparison of a range of green fluorescent protein-tagging vectors for monitoring a microbial inoculant in soil. *Lett. Applied Microbiol.* 32:26-30.
- Díaz, M. P., Ardua, M. V., Carvajal, F. 2001. Informe semestral-1 "Reuso y tratamiento de aguas residuales- Fase I". Laboratorio de Biotecnología. División de Tecnologías Complementarias. Instituto Colombiano del Petróleo.
- Kozdrój, J., Elsas, J. D. 2001. Structural diversity of microorganisms in chemically perturbed soil assessed by molecular and cytochemical approaches. *Journal of Microbiological Methods*. 43:197-212.
- Lorang, J. M., Tuori, R. P., Martínez, J. P., Sawyer, T. L., Redman, R. S., Rollins, J. A., Wolpert, T. J., Johnson, K. B., Rodríguez, R. J., Dickman, M. B. & Ciuffetti, L. M. 2001. Green Fluorescent Protein γ s Lighting Up Fungal Biology. *Appl. Environm. Microbiol.* 67(5): 1987-1994.
- Matthysse, A. G., Stretton, S., Dandie, C., McClure, N. C., Goodman, A. C. 1996. Construction of GFP vectors for use in gram-negative bacteria other than *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*. 145:87-94.
- Muyzer, G. 1999. DGGEATGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinión Microbiology*. 2:317-322.
- Normander, B., Hendriksen, N. B., Nybroe, O. 1999. Green fluorescent protein-marked *Pseudomonas fluorescens*: Localization, viability and activity in the natural barley rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(10):4646-4651.
- Poppenborg, L., Friehs, K., Flaschel, E. 1997. The green fluorescent protein γ s a versatile repórter for bioprocess monitoring. *Journal of Biotechnology*. 58:79-88.

Prasher, D. C. 1992. Primary structure of *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111:229-233.

Ranjard, L, Poly, F., Nazaret, S. 2000. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. *Res. Microb/o/151:167-177*.

Sarand, I., Skarfstad, E., Forsman, M., Romantschuk, M., Shingler, V. 2001. Role of the DmpR-mediated regulatory circuit in bacterial biodegradation properties in methylphenol-amended soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(1): 162-171.

Selvaratnam, B., Shoedel, B., McFarland, C., Kulpa, P. 1997. Application of the polymerase chain reaction (PCR) and reverse transcriptase/PCR for determining the fate of phenol-degrading *Pseudomonas putida* ATCC 11172 in a bioaugmented sequencing batch reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47:236-240.

Valderrama, A. M., Acero, J. R., Vargas, M. C. 1999. II Informe trimestral "Cepario". Laboratorio de Biotecnología. División de Tecnologías Complementarias. Instituto Colombiano del Petróleo. 24.

Verma, I. 1996. "Green light" for gene transfer. *Nature Biotechnology.* 14:576.



Corporación para el Desarrollo Industrial de la Biotecnología y Producción Limpia

**Avenida 15 No. 106-50 Of. 401
Telefax: (57-1) 6293421/6293185/6270371
e-mail: corpodib@cablenet.co
Bogotá, D. C. - Colombia**