

**Anàlisi dels Clostridis productors de toxines
botulíniques en els sediments del sistema d'aiguamolls
construïts (SACs) de l'EDAR d'Empúriabrava**

Magalí Martí i Jesús García-Gil
Departament de Microbiologia
Universitat de Girona

Girona, setembre de 2008

Anàlisi dels Clostridis productors de toxines botulíniques en els sediments del sistema d'aiguamolls construïts (SACs) de l'EDAR d'Empúriabrava

Magalí Martí i Jesús García-Gil

Departament de Microbiologia

Universitat de Girona

Introducció

Clostridium botulinum és un bacteri anaeròbic obligat, gram positiu, formador d'endòspores i productor de neurotoxines botulíniques (BoNTs). La patogenicitat d'aquests bacteris està associada a les BoNTs, exotoxines que causen una paràlisi severa i la mort, tant en humans com en altres espècies animals (1). Són considerades un dels sis agents més perillosos per al bioterrorisme (“category A agents”) segons el “Center for Disease Control and Prevention” (CDC). Aquests bacteris patògens són ubiqües a l'ambient, presents al sòl, als sediments d'aigua dolça i en ambients marins (1). Les neurotoxines es diferencien serològicament i són classificades en 7 grups (del tipus A al G), on els tipus A, B, E i F són les principals responsables del botulisme en humans per intoxicacions alimentàries, mentre que els tipus C i D són els agents causants del botulisme en altres espècies animals (sobretot en peixos i ocells) (2).

El sistema d'aiguamolls construïts (SACs) és un sistema natural de tractament d'aigua residual on l'aigua és depurada mitjançant la combinació de processos físics, químics i biològics. La mineralització de la matèria orgànica present a l'aigua residual és duta a terme per l'activitat microbiana, la qual és elevada gràcies a la combinació de la rizosfera de la vegetació, el sediment, la càrrega de nutrients, la llum solar i l'aigua, que constitueixen un ambient adequat per l'establiment de la comunitat microbiana. A l'època estival, el cabal d'aigua que arriba al SACs de l'EDAR-Empúriabrava, provinent de la depuradora, es veu incrementat respecte la resta de l'any degut a l'augment del consum d'aigua, així com també augmenta la càrrega de nutrients presents a l'aigua. Aquest fet, juntament amb l'augment de la insolació i la necessitat d'aplatjar les aigües per a l'avifauna del Parc Natural causa la hipereutrofització del sistema. La

biomassa algal i vegetal produïda acaba amb una proliferació massiva d'organismes, amb elevades taxes de respiració (consum d'oxigen) per les altes temperatures i els conseqüents episodis d'anòxia que presumiblement causen la germinació de les espores de *Clostridium botulinum* i la síntesi de toxines per part de les cèl·lules vegetatives.

A l'agost del 2006 es va detectar una elevada mortalitat d'aus als aiguamolls. Aquest fet s'atribueix a la presència de clostridis productors de neurotoxines botulíniques, els quals durant la resta de l'any romanen esporulats i en l'època estival, on s'arriba a situacions d'anòxia, les espores germinen i les cèl·lules vegetatives alliberen les neurotoxines.

Tot i la sospita que aquestes mortaldats d'ocells aquàtics són fruit de la proliferació de *C. botulinum*, fins a l'actualitat no existeixen evidències que permetin afirmar-ho. És per aquest motiu que el projecte es centra en l'estudi de la presència i activitat, en els SACs de l'EDAR d'Empúriabrava, de *Clostridium botulinum* productors de la neurotoxina C, la qual afecta a les aus, i de *C. botulinum* tipus E, que afecte a humans i també, en menor grau, a les aus. Per a la seva detecció s'ha utilitzat la tècnica molecular de Reacció en Cadena de la Polimerasa (PCR) per a l'amplificació dels marcadors moleculars BoNT E i BoNT C (gens responsables de la producció de les toxines E i C) (3,4).

Metodologia

Mostreig

La recollida de mostres de sediment es va dur a terme el dia 23 d'agost de 2006 entre les 10 i les 12 hores. Es van recollir 5 mostres de l'estany Europa, 10 de la Cel·la 1, 10 de la Cel·la 2 i 10 de la Cel·la 3. Les mostres es van conservar a -20°C fins la seva anàlisi al laboratori (setembre 2007 – març 2008). De cada mostra se'n van anotar les coordenades GPS i una descripció de l'entorn (veure Annex).

Medi de cultiu

Actualment no es disposa de cap medi de cultiu selectiu i/o diferencial per a *C. Botulinum*. En aquest estudi s'ha utilitzat el medi d'enriquiment TPGY (Trypticase-Peptone-Glucose-Yeast Extract Broth) que és el més utilitzat en estudis de *C. botulinum*. (1,5,6).

Formulació del medi: Trypticase 50g, Peptone 5g, Yeast extract 20g, Dextrose 4g, Sodium thioglycollate 1g, Distilled water 1l. Autoclau 10min a 121°C. pH final 7.0 ± 0.2. Refrigeració a 5°C. (6).

Els cultius s'han incubat en condicions d'anaerobiosi (mitjançant gerres amb bossetes d'anaerobiosi *AnaerogenTM d'Oxoid*) i a 30°C (5,6).

Preparació de les mostres

Xoc tèrmic per a la selecció de bacteris esporulats (1):

- Resuspensió i homogeneïtzació (mitjançant vortex) de 0,5g de pes sec, de les mostres de sediment, en 1mL de Ringer estèril.
- Xoc tèrmic, 10min a 80°C, per a la selecció d'espores.
- Centrífuga suau per recuperar la fase aquosa del sediment (sobrenedant) la qual conté les espores.
- Inoculació del sobrenedant en 15mL de medi TPGY.
- Incubació, en condicions d'anaerobiosi (mitjançant *AnaerogenTM*) a 30°C durant 24 hores, per a la germinació de les espores.
- Observació microscòpica: tinció de Gram.

Extracció d'àcids nucleics

- Extracció d' ADN de 0,5 grams de pes sec de mostres directes del sòl: utilització de kits comercials idonis per a l'extracció d'ADN de mostres de sediment.
 - MOBIO Ultraclean™ Soil ADN kit
 - Fast ADN® SPIN for Soil Kit
- Extracció ADN bacteris cultivats després del xoc tèrmic per a la selecció d'esporelats: utilització de kits comercials idonis per a l'extracció d'ADN de mostres de cultiu cel·lular.
 - NucleoSpin® Blood
 - NucleoSpin® Tissue

Amplificació d'àcids nucleics

Taula 1: Primers universals 27F i 1492R per a l'amplificació del gen 16S rRNA d'Eubacteris (7).

Eubacteria	Primers	Seqüència	Localització	Producte (pb)
16s EUB	27F	5'-AGAGTTTGTATCMTGGCTCAG-3'	-59_-40	1465
	1492R	5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'	703_677	

Taula 2: Primers GF-1 i GF-3 per a l'amplificació del marcador molecular BoNT E (*C. botulinum* tipus E) (3). Primers ToxC-384/625/850R/1049R per a l'amplificació del marcador molecular BoNT C (*C. botulinum* tipus C) mitjançant Nested PCR (4).

Type	Primers	Seqüència	Localització	Producte (pb)
E	GF-1	5'-AAA AGT CAT ATC TAT GGA TA-3'	-59_-40	762
	GF-3	5'-GTG TTA TAG TAT ACA TTG TAG TAA TCC-3'	703_677	
C	ToxC-384	5'-AAACCTCCTCGAGTTACAAGCCC-3'		384_406
	ToxC-850R	5'-GAAAATCTACCCCTCTCCTACATCA-3'		850_827
	ToxC-625	5'-CTAGACAAGGTAACAACCTGGGTTA-3'		625_648
	ToxC-1049R	5'-AATAAGGTCTATAGTTGGACCTCC-3'		1049_1026
	(A) ToxC-384/850R/625	-----		225
	(B) ToxC-625/1049R/850R	-----		

Taula 3: Mix per la PCR del 16s EUB.

Mix	stock	conc final	25ul/mostra
Buffer	10x	1x	2,5
dNTPs	10mM	0,8mM	2
27f	100uM	50uM	0,25
1492r	100uM	50uM	0,25
MgCl ₂	25mM	3,5 mM	2
Taq 5U/ul	5U/ul	0,02 U/ul	0,1
Aigua			16,9
ADN mottle			1

Taula 4: Programa termociclador per la PCR del 16s EUB.

Programa	°C	minuts	cicles
Denat 1	94	4	
Denat	94	30seg	
Annealing	52	1	35
Extensió	72	2	
Final ext.	72	5	

Taula 5: Mix per la PCR del *C. botulinum* Tipus E (3).

Mix	stock	conc final	25ul/mostra
Buffer	10x	1x	2,5
dNTPs	10mM	0,8mM	2
GF-1	50uM	1uM	0,5
GF-3	50uM	1uM	0,5
MgCl ₂	25mM	3,5 mM	3,5
Taq 5U/ul	5U/ul	0,02 U/ul	0,1
Aigua			14,9
ADN mottle			1

Taula 6: Programa termociclador per la PCR del *C. botulinum* tipus E (3).

Programa	°C	minuts	cicles
Denat 1	94	4	
Denat	94	1	
Annealing	50	1	30
Extensió	72	1	
Final ext.	72	10	

Taula 7: Mix per la PCR del *C. botulinum* Tipus C (4).

Mix	stock	conc final	25ul/mostra
Buffer	10x	1x	2,5
dNTPs	10mM	0,8mM	2
F	50uM	1,0uM	0,5
R	50uM	1,0uM	0,5
MgCl ₂	25mM	3,7mM	3,7
Taq 5U/ul	5U/ul	0,02U/ul	0,1
Aigua			14,7
ADN motlle			1

Taula 8: Programa termociclador per la PCR del *C. botulinum* tipus C (4).

Programa	°C	minuts	cicles
Denat 1	94	4	
Denat	94	1	
Annealing	55	1	PCR1:30 Nested:20
Extensió	72	45seg	
Final ext.	72	10	

Per a la visualització dels productes d'amplificació s'ha realitzat un electroforesi amb gel d'agarosa al 1,5% i tampó TBE, una tinció posterior amb bromur d'etidi durant 20 minuts i visualització sota il·luminació UV.

Resultats

Observació al microscopi òptic

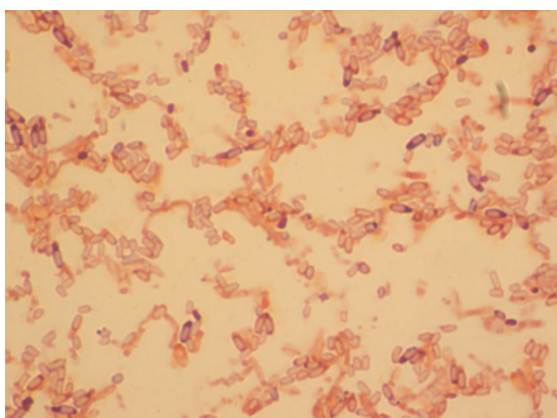


Figura 1: Tinció de gram i observació a 1000x. Espores de *Clostridium* del control positiu *Clostridium botulinum* NCTC 8266; strain Nanaimo (Type E).

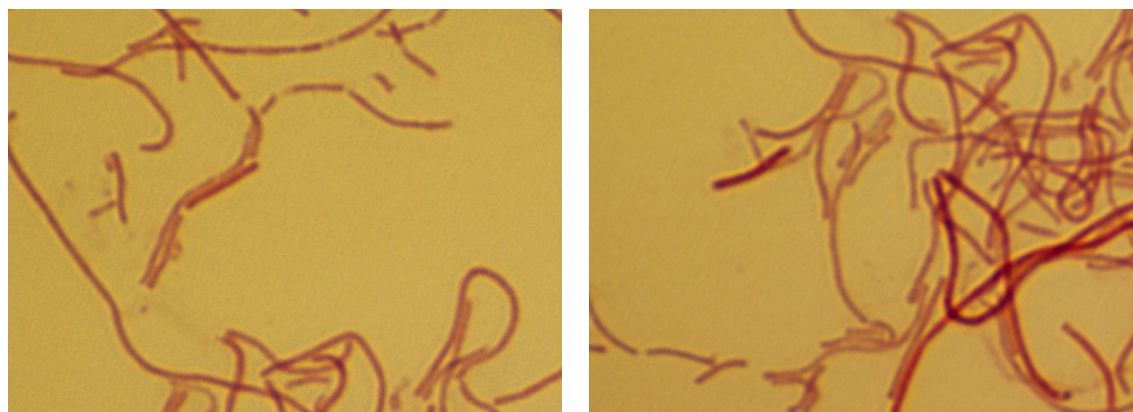


Figura 2: Tinció de gram i observació a 1000 x. Cèl·lules vegetatives de *Clostridium* del control positiu *Clostridium botulinum* NCTC 8266; strain Nanaimo (Type E).

Extracció d'àcids nucleics i amplificació per PCR

L'extracció d'àcids nucleics directament de mostres del sòl (mitjançant els kits comercials d'extracció MOBIO Ultraclean™ Soil DNA kit i Fast DNA® SPIN for Soil Kit) presenta un rendiment molt baix així com, en general, contaminació de proteïnes. La màxima concentració d'àcids nucleics obtinguda és de 94,9ng/μL a la mostra C201 (taula 9).

Per tal d'obtenir un millor rendiment de l'extracció d'ADN es va realitzar un preenriquiment, per incrementar la biomassa mitjançant el cultiu anaeròbic dels bacteris presents al sòl. La mostra va ser prèviament sotmesa a un xoc

tèrmic per tal d'eliminar al màxim nombre de cèl.lules vegetatives i afavorir la germinació de les espores que hi eren presents.

L'extracció d'àcids nucleics a partir de bacteris cultivats després del xoc tèrmic presenta un millor rendiment (veure taula 10), amb un mínim d'aproximadament de 150 ng μl^{-1}) i un màxim d'uns 1000 ng μl^{-1} . Davant d'això l'amplificació de l'ADN per a la detecció dels marcadors moleculars BoNT E i BoNT C es realitza a partir tals mostres.

Taula 9: Rendiment del procediment d'extracció d'ADN directament de mostres del sediment.

Mostra	Extracció ADN		
	ng/uL	260/280	260/230
E01	6,4	1,95	0,29
E02	43,2	1,46	0,53
E03	9	2,2	0,21
E04	15	3,56	0,1
E05	17,6	1,56	0,38
C101	69,4	1,73	0,09
C102	42,4	1,63	0,1
C103	71,2	1,77	0,1
C104	37,6	1,76	0,05
C105	46,8	1,83	0,07
C106	37,9	1,71	0,05
C107	76,7	1,75	0,1
C108	41,4	1,65	0,08
C109	33,2	1,7	0,04
C110	35,3	1,65	0,04
C201	94,9	2,23	0,11
C202	23,5	1,49	0,03
C203	64,6	1,8	0,12
C204	31	1,79	0,05
C205	64,4	1,88	0,09
C206	43,7	1,83	0,09
C207	27,7	1,56	0,06
C208	47,5	1,97	0,08
C209	18,4	1,62	0,03
C210	64	1,78	0,16
C301	40,9	1,7	0,06
C302	61,7	1,77	0,08
C303	54,1	1,73	0,08
C304	35,2	1,74	0,06
C305	64,7	1,8	0,1
C306	45,4	1,73	0,08
C307	56,1	1,76	0,09
C308	53,7	1,83	0,07
C309	43,3	1,86	0,06
C310	44,3	1,72	0,06

Taula 10: Rendiment d'extracció d'ADN a partir del preenriquiment. I Resultats de l'amplificació dels marcadors moleculars per PCR

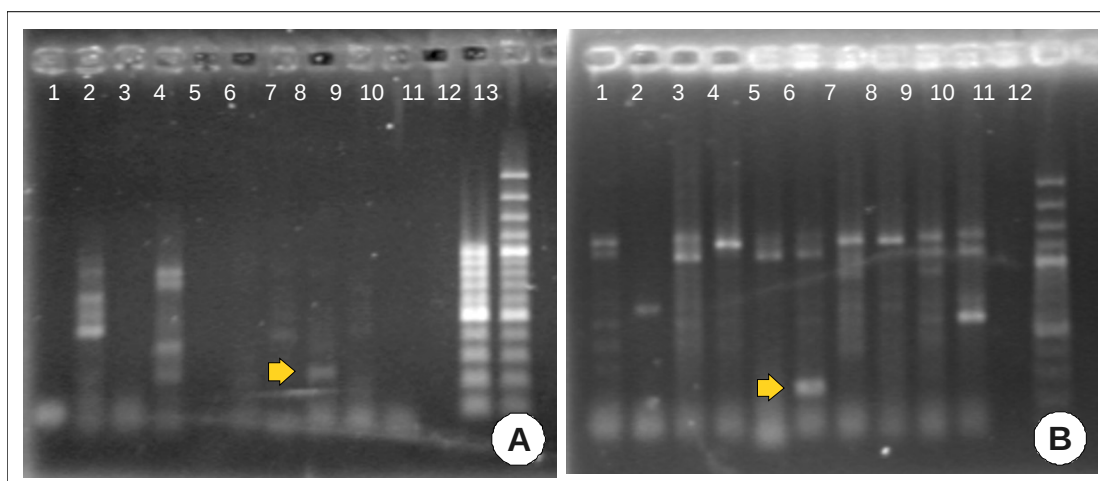
Mostra	Extracció ADN			16s rRNA	Amplificació ADN per PCR			
	ng/uL	260/280	260/230		Type E	Ctrl intern E	Type C (A)	Type C (B)
E01	806,6	2,14	2,39	+	-	+	-	-
E02	873,5	2,14	2,38	+	-	+	-	-
E03	1407,3	2,18	2,38	+	-	+	-	-
E04	435,2	2,19	2,41	+	-	+	-	-
E05	421,5	2,21	2,47	+	-	+	-	-
C101	1132,4	2,16	2,34	+	-	+	-	-
C102	703,1	2,13	2,1	+	-	+	-	-
C103	827,7	2,17	2,43	+	-	+	-	-
C104	494,0	2,21	2,41	+	-	+	-	-
C105	574,6	2,2	2,41	+	-	+	-	-
C106	466,6	2,17	2,38	+	-	+	-	-
C107	300,2	2,17	2,4	+	-	+	-	-
C108	882,6	2,14	2,16	+	-	+	-	+
C109	710,0	2,19	2,22	+	-	+	-	-
C110	286,4	2,19	2,11	+	-	+	-	-
C201	507,7	2,2	2,46	+	-	+	-	-
C202	668,8	2,2	2,37	+	-	+	-	-
C203	950,1	2,21	2,44	+	-	+	-	-
C204	707,6	2,24	2,35	+	-	+	-	-
C205	753,4	2,2	2,3	+	-	+	-	-
C206	98,7	2,11	2,37	+	-	+	-	-
C207	1487,6	2,17	2,29	+	-	+	-	-
C208	180,0	2,14	2,42	+	-	+	-	-
C209	1511,0	2,18	2,33	+	-	+	-	-
C210	951,2	2,23	2,36	+	-	+	-	-
C301	1132,4	2,21	2,43	+	-	+	-	-
C302	169,9	2,14	2,47	+	-	-	-	-
C303	338,1	2,19	2,42	+	-	+	-	-
C304	494,0	2,21	2,41	+	-	+	-	-
C305	393,9	2,2	2,36	+	-	+	-	-
C306	466,6	2,17	2,38	+	-	+	+	-
C307	44,1	2,63	1,77	+	-	+	-	-
C308	882,6	2,26	2,3	+	-	+	-	-
C309	662,2	2,24	2,44	+	-	+	-	-
C310	153,6	2,15	2,45	+	-	+	-	-

Totes les mostres d'ADN provinents del cultius van ser amplificables amb els primers universals 27F i 1492R per a l'amplificació del gen 16S rRNA d'Eubacteris, fet representatiu de la presència d'Eubacteris a les mostres de sediment del SAC's de l'EDAR d'Empúriabrava.

L'amplificació del marcador molecular específic per *Clostridium*, BoNT E, ha donat negativa per a totes les mostres. El control intern, a excepció de la mostra C302, confirma que la reacció de la PCR no és inhibida.

D'altra banda, l'amplificació mitjançant la tècnica de "Nested PCR" del marcador molecular BoNT C, indicador de la presència de *C. botulinum* tipus C, ha donat positiva per a dues mostres (C108 i C306).

La manca d'un control positiu apropiat de *Clostridium* tipus C, no disponible a la "Colección Española de Cultivo Tipo" (CECT) dificulta la confirmació dels positius, tot i que el fragment obtingut presenta la grandària esperada. La confirmació definitiva es realitzarà per seqüenciació dels productes d'amplificació.



Gel A. 1: C101; 2:C102; 3:C103; 4: C104; 5: C105; 6: C106; 7: C107; 8: C108; 9: C109; 10: C110; 11: NTC; 12: Marcador 100 pb; 13: Marcador 100-3000 pb.
Gel B. Gel A. 1: C301; 2:C302; 3:C303; 4: C304; 5: C305; 6: C306; 7: C307; 8: C308; 9: C309; 10: C310; 11: NTC; 12: Marcador 100-3000 pb.

Discussió

Les mostres d'ADN extretes dels cultius són “amplificables” amb primers universals de 16S rRNA d'Eubacteris, de manera que després del xoc tèrmic (on s'eliminen la majoria de cèl·lules vegetatives) i el posterior cultiu en condicions d'anaerobiosi, posa de manifest que l'ADN amplificat només pot provenir de bacteris formadors d'espores, ja que es parteix de l'assumpció que a les mostres de sediment no hi ha cèl·lules vegetatives degut a les condicions de l'ambient en el moment del mostreig (tal com s'ha comentat anteriorment a la introducció). Atès que de bacteris formadors d'espores bàsicament s'en coneixen el gènere *Clostridium* i el gènere *Bacillus* i que ambdós gèneres són ubicus a l'ambient, les condicions d'enriquiment porten a conculore que l'ADN amplificat pel 16S rRNA, tant sols pot provenir del gènere *Clostridium*, doncs *Bacillus* requereix de condicions aeròbiques.

Atès que l'amplificació dels marcadors moleculars BoNT E va resultar negativa i per descartar la presència d'inhibidors de la reacció que produïssin aquest resultat, es va realitzar un control intern. A excepció de la mostra C302, totes les mostres han donat positiu per al control intern d'amplificació, per tant podem confirmar que *C. botulinum* tipus E no és detectable en les mostres analitzades amb la metodologia emprada. Això també és aplicable al tipus C, ja que l'amplificació dels marcadors s'ha realitzat a partir de la mateixa extracció d'ADN.

L'amplificació del marcador molecular BoNT C (*C. botulinum* tipus C) mitjançant *Nested PCR* va resultar positiva per a les mostres C108 i C306 (mostra número 8 de la cel·la 1 del SAC i mostra número 6 de la cel·la 3 del SAC, respectivament). Cal tenir en compte el micro-entorn on aquestes dues mostres van ser preses, que contenia el cadàver d'un ocell (veure Annex). A falta de confirmació per seqüenciació, podem confirmar la presència de *C. botulinum* productor de toxines en el sediment estudiat, tot i que aquesta està fortament relacionada amb la presència d'animals en descomposició.

Tal i com s'ha comentat a la introducció, davant la diversitat de subtipus de *Clostridium*, es va decidir estudiar el tipus E i el tipus C. No obstant, només s'ha detectat el tipus C en dues mostres.

Els bacteris al sòl es distribueixen de forma heterogènia, i pot existir un biaix en els resultats, com a conseqüència d'aquesta heterogeneïtat. Els grups bacterians amb un fort component metabòlic i fisiològic com ara els clostridis (anaerobis i fermentadors obligats) tendeixen a aparèixer en aquelles parts del sistema que reuneixen les condicions fisico-químiques per al seu creixement. Aquest nínxol sol ser força limitat en el temps i l'espai considerant que els aiguamolls estudiats estan sotmesos a una forta aireació i mescla turbulenta. Per tant només apareixen les condicions de forma ocasional si en un microentorn determinat es produeix un dèficit d'oxigen, tal i com succeeix molt localment quan la matèria orgànica es descomposa i l'ambient no pot reposar l'oxigen consumit.

Un altre aspecte a considerar, particularment en aquest estudi, és l'escàs èxit obtingut en el cultiu de Clostridis. Això podria confirmar la baixa prevalença d'aquests bacteris en l'ecosistema estudiat tot i que no es pot descartar la baixa "cultivabilitat" de les varietats ambientals d'aquests organismes, un fet cada vegada més palès en l'Ecologia Microbiana. L'ús de tècniques moleculars ajuda a superar aquesta limitació, i per tant el baix índex de detecció de gens de toxines convida a pensar que *C botulinum* és absent en els sistema estudiat o al menys que els seus nombres estan per sota els nivells de detecció de la tècnica emprada.

Conclusions

- La cultivabilitat dels clostridis presents al sistema estudiat és molt baixa.
- No s'ha detectat *Clostridium botulinum* Tipus E.
- L'existència dels positius de *Clostridium botulinum* Tipus C revela que *Clostridium botulinum* està present als SACs però en poca quantitat, amb una distribució heterogènia,, probablement lligada a la presència de matèria orgànica (animals) en descomposició

- En termes generals es pot afirmar que la presència de espècies tòxiques del gènere Clostridium en els SAC de l'EDAR d'Empúriabrava és nul·la o irrellevant des d'un punt de vista ecològic.

Referències

- (1) **Maria Dahlenborg, Elisabeth Borch and Peter Radström.** (2001). *Development of a Combined Selection and Enrichment PCR Procedure for Clostridium botulinum Types B, E and F and Its Use To Determine Prevalence in Fecal Samples from Slaughtered Pigs.* Applied and Environmental Microbiology, Oct. 2001, p. 4781-4788.
- (2) **Patrick Fach, Maryse Gibert, Remy Griffais, Jean Pierre Guillou and Michel R. Popoff.** (1995). *PCR and Gene Probe Identification of Botulinum Neurotoxin A, B, E, F and G Producing Clostridium spp. and Evaluation in Food Samples.* Applied and Environmental Microbiology, Jan. 1995. P. 389-392.
- (3) **Giovanna Franciosa, Joseph L. Ferreira and Charles L. Hatheway.** (1994). *Detection of Type A, B and E Botulism Neurotoxin Genes in Clostridium botulinum and Other Clostridium Species by PCR: Evidence of Unexpressed Type B Toxin Genes in Type A Toxigenic Organisms.* Journal of Clinical Microbiology, Aug. 1994, p. 1911-1917.
- (4) **Judy L. Williamson, Tonie E. Rocke and Judd M. Aiken.** (1999). *In Situ Detection of the Clostridium botulinum Type C₁ Toxin Gene in Wetland Sediments with a Nested PCR Assay.* Applied and Environmental Microbiology, July 1999, p. 3240-3243.
- (5) **Sebastian Hielm et al.** (1996). *Detection of Clostridium botulinum in fish and environmental samples using polymerase chain reaction.* International Journal of Food Microbiology 31 (1996) 357-365.
- (6) **Bacteriological Analytical Manual Online.** 2001. U.S. FDA. Web: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-17.html>
- (7) **Ankia M. Wagner and Eugene T. Cloete.** (2002). *16S rRNA Sequence Analysis of Bacteria Present in Foaming Activated Sludge.* Systematic and Applied Microbiology. Volume 25, Issue 3, 2002, Pages 434-439.
- (8) **Todar's Online Textbook of Bacteriology.** <http://www.textbookofbacteriology.net/>

Annex

Mostreig sediments SAC i Estany Europa. Estiu 2006

Data de recollida de mostres: 23 d'agost de 2006, entre 10 i 12 hores.

Abreviacions:

C1: Cel·la 1

C2: Cel·la 2

C3: Cel·la 3

E: Estany Europa

Codi del punt de mostreig	Coordenades GPS		Vegetació	Aus mortes	Observacions
	X	Y			
C1-01	0508456	4677109	Balca		
C1-02	0508457	4677103	Canyís		
C1-03	0508488	4677086	Canyís		
C1-04	0508509	4677056	Balca		
C1-05	0508537	4677066	Sense		
C1-06	0508537	4677036	Sense	+	
C1-07	0508554	4677039	Sense		
C1-08	0508545	4677010	Sense	+	
C1-09	0508551	4677003	Balca		
C1-10	0508583	4677020	Sense		
C2-01	0508415	4677075	Balca		
C2-02	0508441	4677086	Sense		
C2-03	0508434	4677059	Balca		
C2-04	0508465	4677070	Sense		Agafada en marge cel·la
C2-05	0508450	4677049	Canyís		
C2-06	0508452	4677031	Sense	+	
C2-07	0508477	4677035	Canyís		
C2-08	0508513	4677023	Tamariu		Agafada prop del marge
C2-09	0508487	4676993	Sense	+	
C2-10	0508491	4676963	Balca		
C3-01	0508392	4677057	Canyís		
C3-02	0508410	4677033	Canyís		
C3-03	0508392	4677016	Balca	+	
C3-04	0508409	4677025	Sense	+	
C3-05	0508419	4677007	Sense		
C3-06	0508412	4676994	Sense	+	
C3-07	0508421	4676949	Tamariu		
C3-08	0508451	4676945	Sense		
C3-09	0508471	4676939	Canyís		
C3-10	0508480	4676933	Balca		
E01	0508579	4676939	Sense	+	
E02	0508592	4676925	Balca		
E03	0508604	4676884	Sense		Canal entorn illa (sec)
E04	0508668	4676854	Sense		
E05	0508620	4676834	Sense		Costat del canal, prop de zona embassada