

# Investigación preliminar sobre un innovador proceso de limpieza de la microflora de origen antropogénico en la Cueva de Pozalagua (Karrantza, Bizkaia)

## Preliminary research on an innovative cleaning process for anthropologically originated microflora in Pozalagua Cave (Karrantza, Bizkaia)

I. Martínez-Arkarazo<sup>(1)</sup>, M. Angulo<sup>(1)</sup>, J.M. Madariaga<sup>(1)</sup>, J. Les<sup>(2)</sup>

- (1) I. Martínez-Arkarazo, Kimika Analitikoko Saila – Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science and Technology, University of the Basque Country (EHU/UPV), P.O. Box 644, E-48080, Bilbao, Basque Country, Spain. E-mail: [qabmaari@lg.ehu.es](mailto:qabmaari@lg.ehu.es).
- (2) Jabier Les, Sociedad de Ciencias Espeleológicas Alfonso Antxia. E-mail: [jabierles@yahoo.es](mailto:jabierles@yahoo.es).

### RESUMEN

Al objeto de buscar un tratamiento de limpieza alternativo a los procesos agresivos actualmente utilizados, se ha procedido a caracterizar física y químicamente el medio ambiente y los espeleotemas de la cueva. Se ha medido la temperatura, humedad, y concentración de CO<sub>2</sub> ambientales, la composición de las aguas por cromatografía iónica y la composición mayoritaria por espectroscopía de microsonda Raman en las paredes de la cueva (dolomita) y en los espeleotemas (calcita, aragonito). Este conocimiento ha permitido diseñar protocolos de actuación para eliminar o disminuir el “mal verde” presente y retardar su futura aparición, con la posibilidad de realizar distintas actuaciones en función de las necesidades. La eficacia de la limpieza obtenida se puede constatar visualmente y mediante espectroscopia Raman, por comparación de las pendientes de los espectros de zonas con distinta problemática (libre de “mal verde”: -1.22, presencia débil: -14.1, presencia fuerte: -492.4).

**Palabras clave:** Cromatografía iónica, Espectroscopia de microsonda Raman, Espeleotema, Limpieza, Microflora.

### ABSTRACT

In order to find an alternative cleaning process to present used aggressive ones, the environment and speleothems of the cave have been characterised physically and chemically. Environment temperature, humidity and CO<sub>2</sub> concentration, water's composition by ionic chromatography, and principal components by Raman microprobe spectroscopy on cave's walls (dolomite) and on speleothems (calcite, aragonite) have been measured. This knowledge has let to design intervention protocols for the elimination and decrease of “green evil” and for delaying future appearance, with the possibility of having interventions alternatives depending on necessities. The effectiveness of used cleaning process can be checked visually or by Raman spectroscopy, comparing different affected zones spectra's slopes (“green evil” free: -1.22, weak presence: -14.1, strong presence: -492.4).

**Key words:** Cleaning process, Ionic chromatography, Microflora, Raman microprobe spectroscopy, Speleothem.

## 1. Introducción

La Cueva de Pozalagua situada en la Sierra de Ranero, en el valle de Karrantza (Bizkaia), es una de las más perfectas muestras de estalactitas excéntricas del mundo. A consecuencia del acondicionamiento de la cueva con objeto turístico y del gran número de visitas recibidas, se han registrado modificaciones en el ambiente de la cueva (Les J. *et al.*, 2005, Madariaga J.M. *et al.*, 2004), hecho que ha sido documentado en el caso de otras cuevas turísticas (Cigna AA. *et al.* 1983; Hoyos *et al.*, 1998; Hoyos *et al.*, 1993; Villar E. *et al.*, 1986; Villar E. *et al.*, 1984). Estas modificaciones ambientales han originado cambios en la apariencia de los espeleotemas relacionados, por un lado con la aparición del denominado “mal verde”, debido a la colonización de distintas especies como

bacterias, algas, líquenes, musgos e incluso helechos (Ariño X., and Saiz-Jimenez C., 1996; Groth I. *et al.*, 2001; Groth I. *et al.*, 1999; Laiz L. *et al.*, 2003) y por otro lado con la contaminación por compuestos de carbono que se fijan en su crecimiento (Young G. *et al.*, 2003).

Si bien el segundo efecto es imposible de eliminar, el “mal verde” se minimiza a través de limpiezas periódicas. Esta limpieza se realiza actualmente en base a procesos agresivos, tanto por ataque químico (ácido clorhídrico, ácido hipocloroso, etc. (Faimon J. *et al.*, 2002)) como por acción mecánica (restregado, cepillado, etc.), dando lugar a una mayor degradación de los espeleotemas.

## 2. Objetivos

A partir del diagnóstico del estado de conservación de la cueva (caracterización física y química del medio ambiente, roca primaria y espeleotemas), se pretende diseñar un innovador proceso de limpieza para (a) eliminar o disminuir el “mal verde”, (b) retardar su futura aparición.

## 3. Resultados y discusión

Para la realización de este estudio, se han seleccionado las cuatro zonas marcadas en la Figura 1. Dentro de cada zona se han elegido los puntos que presentan mayor problemática en cuanto a presencia de microflora adherida a espeleotemas.

En dichos puntos se han tomado muestras de desprendimientos de pared y espeleotemas así como muestras de agua tomadas del goteo de estalactitas y de los gours del suelo.

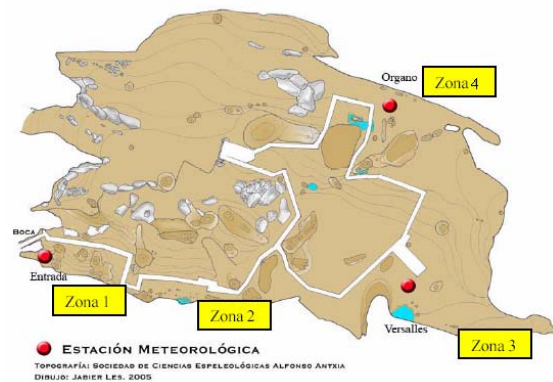


Figura 1. Zonas seleccionadas para la caracterización, estudio físico-químico y tratamiento de limpieza.

### 3.1. Caracterización de los espeleotemas

El entorno de la Cueva de Pozalagua es fundamentalmente dolomítico (Les J. *et al.*, 2005). La espectroscopía Raman es una técnica analítica que permite la caracterización de materiales a través de la posición de sus bandas en el espectro vibracional. La posición de dichas bandas, en el espectro Raman, para la dolomita  $\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$ , están en 1098, 725 y  $300 \text{ cm}^{-1}$  (Edwards H.G.M. *et al.*, 2005).

La Figura 2 recoge el espectro Raman de la dolomita obtenido sobre una muestra procedente de un desprendimiento de la pared de la cueva en la zona 4.

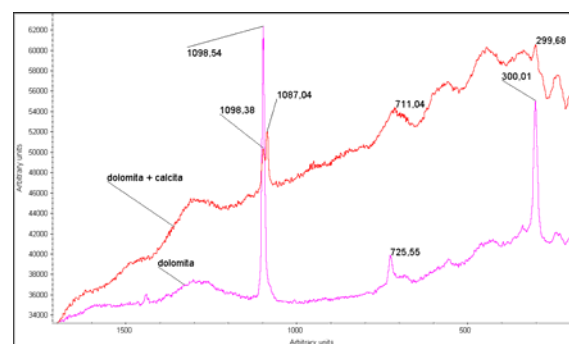


Figura 2. Espectros de una muestra de desprendimiento de pared de la zona 4. Aparición conjunta de dolomita con calcita y dolomita en solitario.

La dolomita sólo se ha detectado en muestras procedentes de desprendimientos de la pared de la cueva, sólo o en presencia de calcita (bandas Raman en 1086, 713 y  $283 \text{ cm}^{-1}$ , (Edwards H.G.M. *et al.*, 2005) tal como se observa en la Figura 2. Las bandas anchas y la fluorescencia que se observan en ambos espectros están motivadas por la presencia de arcilla, silicatos, óxidos de hierro, etc.

En el resto de muestras, tomadas de desprendimientos de espeleotemas, no se ha detectado presencia de dolomita sino únicamente compuestos de carbonato cálcico, cristalizado tanto en forma de calcita como de aragonito (bandas Raman en 1086, 704 y 208  $\text{cm}^{-1}$  Edwards H.G.M. *et al.*, 2005). En la Figura 3 se recogen varios ejemplos de espectros Raman obtenidos sobre dichas muestras en las que el carbonato cálcico ha cristalizado únicamente como aragonito o calcita (Fig. 3a) y en ocasiones, ambas conjuntamente (Fig. 3b).

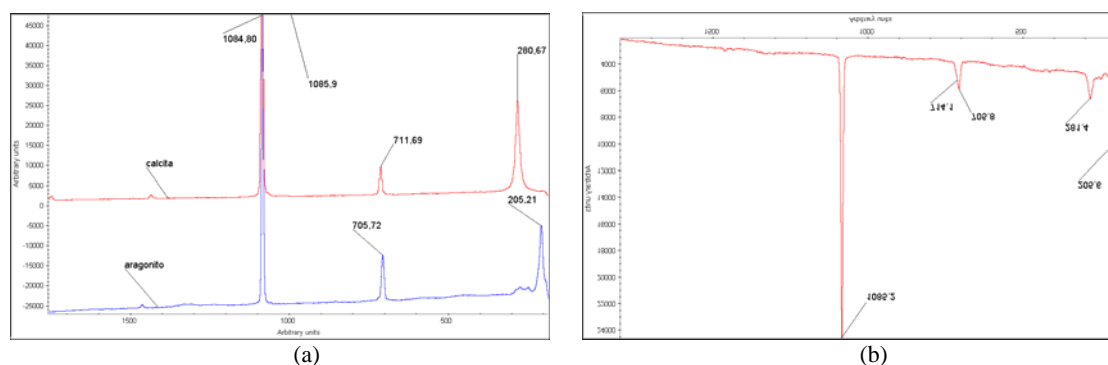


Figura 3. (a) Espectros de aragonito de una estalactita de zona 2 y calcita de una estalactita de zona 3. (b) Aparición conjunta de ambas especies, aragonito y calcita, en una muestra de zona 2

Debido a los procesos de descalcificación, muchas de las muestras recogidas en el suelo de la cueva presentan una superficie con zonas cristalinas y zonas pulverulentas, tal como se observa en la Figura 4.

Curiosamente la composición química en ambas zonas de la muestra de la Figura 4 es calcita, sin que se hayan detectado trazas de otras fases minerales. Sin embargo, en otras muestras con un aspecto superficial cristalino similar se han podido distinguir, mediante sus espectros Raman, las formas polimorfas aragonito y calcita.



Figura 4. Distinto aspecto superficial en una muestra de zona 3 donde se observa el aspecto pulverulento de las zonas afectadas por decarbonatación.

### 3.2-Parámetros físico-químicos de la cueva

Con objeto de realizar un estudio microclimático de la cueva se colocaron tres estaciones de recogida continua de datos en el interior de la cavidad (Junio 2004 a Junio 2005): en la entrada (zona 1), en la sala Versailles (zona 3) y en la sala Órgano (zona 4), Así mismo, se colocó otra en el exterior, en el tejado del edificio de acceso a la entrada a la cueva.

En la Figura 5 se recoge el comportamiento de la temperatura y la concentración de  $\text{CO}_2$  medidos en las citadas estaciones, junto con la afluencia de visitantes. Aunque en la Sala Versailles (zona 3), zona de mayor tiempo de permanencia por parte de las visitas, la temperatura es algo superior que en la Sala del Órgano, no hay correlación entre este parámetro y el número de visitas. Sin embargo sí existe una fuerte correlación para la concentración de  $\text{CO}_2$  (ver Fig. 5b), llegando en verano a duplicar (900-1100  $\text{mg/l}$ ) los niveles medios de concentración más bajos (425-550  $\text{mg/l}$ ), registrados en febrero donde se da una baja afluencia de público.

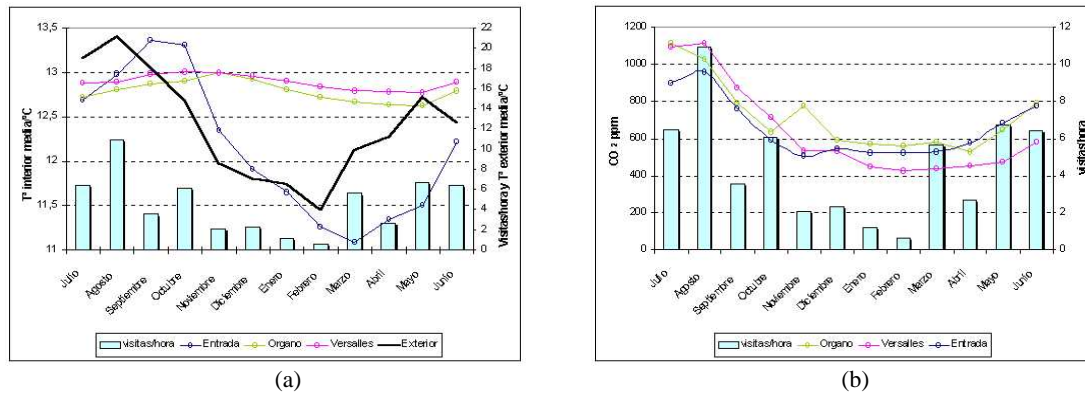


Figura 5: Comportamiento de la temperatura y la concentración de CO<sub>2</sub> en el periodo comprendido entre junio de 2004 y junio de 2005.

En la tabla 1 se recogen valores de parámetros ambientales medidos mediante instrumentación portátil en los puntos con mayor acumulación de microflora. En estos puntos, el aumento de temperatura, respecto de la media en la cueva, es superior a los 5°C, lo que conlleva la pérdida de más de un 20% en humedad relativa, favoreciendo las condiciones para la acumulación de microflora. Este aumento de temperatura y disminución de humedad está motivado, en este caso, por el tipo de foco utilizado en la iluminación de estos puntos (Cigna AA., 1993, Madariaga J.M. *et al.*, 2004).

Tabla 1: Parámetros ambientales de los puntos de mayor acumulación de microflora.

Punto	09-11-04			18-11-04			07-12-04		
	T (°C)	H (%)	PR	T (°C)	H (%)	PR	T (°C)	H (%)	PR
1-1	18.8	79.8	15.2	15	74.8	10.5	19.0	69.6	13.3
1-2	17.1	83.4	14.2	13	96.4	12.4	15.2	86.1	12.9
1-3	17.8	84.9	15.2	13	96.6	12.5	14.6	92.3	13.4
2-1	-	-	-	-	-	-	14.5	98.9	14.3
3-1	-	-	-	-	-	-	13.8	99.9	13.8
3-2	-	-	-	-	-	-	13.8	99.9	13.8

\*T: temperatura ambiental; H: humedad; PR: punto de rocío.

Los datos de cromatografía iónica obtenidos en la caracterización del agua que fluye por los espelotemas y la que se acumula en los gours se recogen en las tablas 2 y 3 respectivamente. Los dos tipos de aguas tienen similares valores de pH, conductividad y concentración de sales, no existiendo marcadas diferencias entre las distintas zonas de la cueva. Estos resultados deben interpretarse con precaución, ya que son valores medios de muestras tomadas durante dos meses y se sabe que la concentración de iones de las aguas de una cueva puede variar con el periodo estacional (Tatár E. *et al.*, 2004).

Tabla 2: Valores medios (Nov. y Dic. 2004) de parámetros medidos en agua de estalactitas.

Zona	pH	Cond. (µS)	Cl mg/l	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> mg/l	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> mg/l	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> mg/l
1	8.1	202	7.7 ± 1.1	114.5 ± 10.9	3.9 ± 0.2	1.0 ± 0.1
2	8.3	265	6.5 ± 1.1	172.8 ± 18.5	5.1 ± 0.2	<LD
3	8.3	274	10.7 ± 1.1	154.0 ± 17.6	2.1 ± 0.2	2.7 ± 0.1
4	8.2	221	8.9 ± 1.1	125.4 ± 11.5	3.2 ± 0.2	0.3 ± 0.1

\* <LD: por debajo del límite de detección.

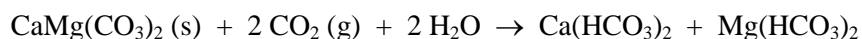
Tabla 3: Valores medios (Nov. y Dic. 2004) de parámetros medidos en agua de gours.

Zona	pH	Cond. (µS)	Cl mg/l	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> mg/l	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> mg/l	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> mg/l
1*	-	-	-	-	-	-
2	8.0	277	11.6 ± 1.1	142.3 ± 12.6	4.6 ± 0.2	4.6 ± 0.2
3	8.1	241	10.4 ± 1.1	128.1 ± 11.7	4.2 ± 0.2	1.6 ± 0.1
4	8.0	231	8.9 ± 1.1	126.0 ± 11.5	3.2 ± 0.2	0.3 ± 0.1

\*No existen gours en la zona 1

### 3.3. Intensidad del proceso de descarbonatación de la cueva

El alto contenido de CO<sub>2</sub> debido a las visitas acelera el proceso natural de descarbonatación. Teniendo en cuenta que el material base es dolomita, el proceso de descarbonatación se produce en base a la siguiente reacción sólido-gas:



Los productos formados, bicarbonato de calcio y el bicarbonato de magnesio, son sales solubles. Por tanto cuando el agua de lluvia entra en la cueva disuelve estas sales. La composición química de esas aguas se ha recogido en las tablas 2 y 3. El valor de pH observado en los distintos puntos (oscila entre 8.0 y 8.3) es muy significativo de cara a entender qué está pasando. Una disolución pura de bicarbonato de calcio o de bicarbonato de magnesio da un pH, en función de la concentración, que oscila entre 8.35 (disoluciones muy diluidas) hasta 7.95 (disoluciones con una concentración doble a la reflejada en las tablas 2 y 3). Esto quiere decir:

- El agua de lluvia sólo disuelve los productos de degradación ya formados, ya que el pH recogido en las tablas 2 y 3 es el que darían disoluciones puras de bicarbonato.
- El agua de lluvia no ha podido captar suficientes ácidos orgánicos, en su tránsito hasta el interior de la cueva, como para acidificar el agua producida tras la disolución de los bicarbonatos cálcico y magnésico.
- El agua de los gours tiene casi el mismo pH que el agua del goteo de las estalactitas lo que indica que la captación de CO<sub>2</sub> atmosférico no es significativa durante su periodo de residencia en la cueva, es decir, el nivel de CO<sub>2</sub> no es tan alto como para acelerar la descalcificación de la cueva a través de reacciones de las sales disueltas con los materiales de la cueva
- La única reacción importante de descarbonatación es la expresada anteriormente y sus productos de reacción son los que condicionan las características de las aguas obtenidas.

### 3.4. Respuesta Espectroscópica en función de la intensidad del “mal verde”

En este trabajo se ha verificado que la línea base de los espectros Raman toma una u otra pendiente en función de la extensión del “mal verde”. A modo de ejemplo se muestran en la Figura 6 los espectros obtenidos sobre tres zonas de una espeleotema. Los valores encontrados de pendiente para la línea base espectral oscilan entre 1.2 para una superficie libre de “mal verde”, 14.2 para una superficie con una débil presencia y 492.4 para una superficie con una gran colonización de microflora verde.

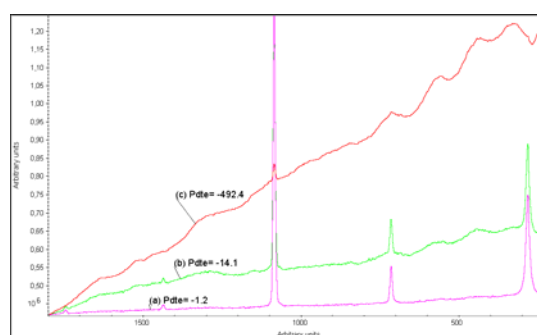


Figura 6: Espectros Raman de (a) estalactita libre de “mal verde”, (b) estalactita con coloración débil, (c) estalactita con coloración fuerte.

Visualmente se aprecia que las zonas de mayor intensidad de “mal verde” son aquellas en las que existe un mayor ataque a la superficie pétreo, bien sea producido por los procesos de descarbonatación o por la deposición de arcillas arrastradas por las aguas de goteo.

### 3.5. Limpieza de los espeleotemas

El sistema de limpieza utiliza dos productos: (1) un líquido limpiador no ácido y (2) un emplasto compuesto por el líquido limpiador, una resina de intercambio iónico y un aglutinante que le confiere las características necesarias para su aplicación en superficies verticales y/o horizontales.

El protocolo de limpieza consta de un lavado inicial (fase 0), mediante pulverizado con agua, seguido de tres fases que suponen la aplicación de condiciones de tratamiento con mayor poder limpiador. El aplicar una, dos o las tres fases será función de las necesidades en cada zona a tratar. El grado de suciedad (“mal verde” y demás contaminantes) se puede determinar semicuantitativamente comparando la pendiente de los espectros Raman de las zonas a tratar con la de las zonas que no necesitan tratamiento y que se toman como referencia. Dicho protocolo comprende:

**FASE 0:** Esta etapa consiste en el pulverizado, con el propio agua de la cueva, de la superficie a limpiar al objeto de eliminar los materiales débilmente adheridos a la superficie a tratar.

**FASE 1:** Se pulveriza el líquido limpiador y se deja actuar durante 10 minutos, tras los cuales se retiran los posibles restos con agua propia de la cueva. En esta fase se eliminan “las manchas” menos ancladas, consiguiendo zonas afectadas más reducidas.

**FASE 2:** Se aplica papel de restauración en la zona a tratar y se empapa con el líquido limpiador. A continuación se aplica el emplasto tal como se observa en la Figura 7. Para evitar que la concentración inicial de estos emplastos disminuya por captación del agua ambiental (humedad relativa próxima al 100%), se protegen con un plástico tipo Parafilm®. Una vez retirado el emplasto se eliminan los restos mediante pulverizado con agua de la cueva.

**FASE 3:** Utilización de emplastos de mayor concentración en el líquido limpiador. Se aplica del mismo modo que la Fase 2. Esta fase sólo se ejecutará en aquellos casos en los que no se consiga eliminar la suciedad durante la Fase 2.

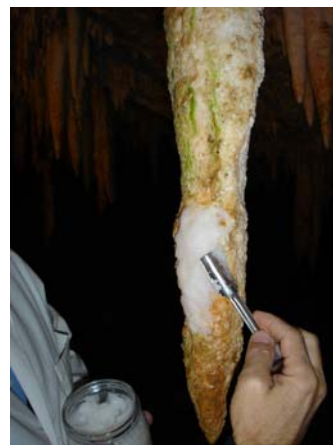


Figura 7. Aplicación de las Fases 2 y 3.

Para demostrar la viabilidad de este innovador protocolo de limpieza, se seleccionaron dos estalactitas de la zona 3, junto a la sala Versailles. Las figuras 8 y 9 muestran las imágenes de las dos estalactitas antes y después de ser tratadas. A la estalactita de la Figura 8 se le dieron tres aplicaciones de la Fase 1, mientras que a la estalactita de la Figura 9 se le dieron seis aplicaciones de la Fase 2.

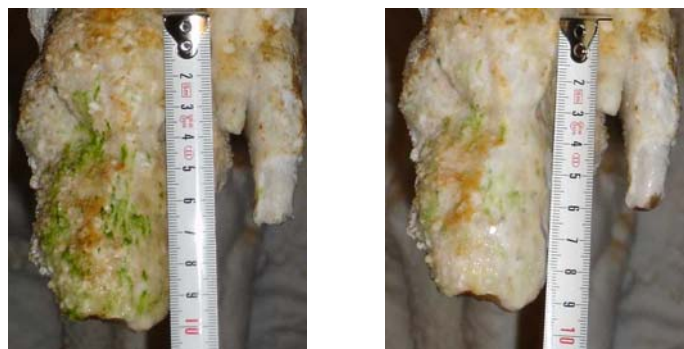


Figura 8. Aspecto inicial y final tras 3ª aplicación de la Fase 1 en una estalactita de la zona 3

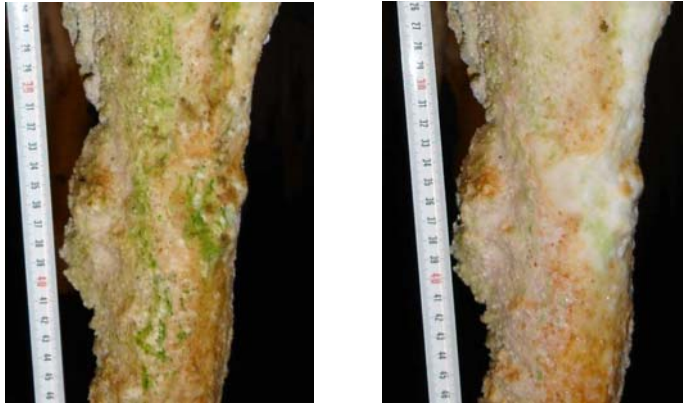


Figura 9. Aspecto inicial y final tras 6ª aplicación de la Fase 2 en una estalactita de la zona 3.

A medida que se van dando diferentes aplicaciones, se observa un efecto visual de “pulido químico”. En realidad la limpieza está eliminando micromateriales adheridos a los cristales, poniendo al descubierto cristales no degradados y, por tanto, la superficie pétreo original que siempre tiene un menor tamaño de poro que el de las superficies degradadas o colonizadas por el “mal verde”.

#### 4. Conclusiones

1. Las visitas no producen cambios en la temperatura del interior de la cueva pero sí en la concentración de  $\text{CO}_2$ , llegando ésta a duplicarse en los meses de verano respecto de los valores de mínima concentración. Este  $\text{CO}_2$  es el responsable de los procesos de descarbonatación detectados aunque éstos no parecen ser preocupantes.

2. El agua acumulada en los gours y la recogida directamente en las estalactitas tienen similares valores pH, conductividad y concentración de sales. Sus características están marcadas por una pobre captación de sales en su tránsito hasta el interior de la cueva y por una alta disolución de los bicarbonatos de calcio y magnesio producidos en los procesos de descarbonatación.

3. Los espectros Raman obtenidos constatan que la roca madre de la cueva es de carácter dolomítico y que el único compuesto presente en las concreciones de la cueva de Pozalagua es el carbonato cálcico, que se encuentra cristalizado como aragonito y calcita.

4. Los puntos donde se ha detectado mayor proliferación de musgo se encuentran junto a los focos de iluminación, donde existen valores menores de humedad relativa y mayores de temperatura.

5. El procedimiento de limpieza propuesto es eficaz en la eliminación de restos de arcilla y demás productos de la descarbonatación así como de la microflora, independientemente del grado de suciedad que presenten las superficies a tratar (ver Figura 8 y Figura 9).

6. La espectroscopia Raman es una técnica semicuantitativa que permite determinar el nivel de limpieza alcanzado de forma rápida y no destructiva.

7. El proceso de limpieza propuesto respeta el aspecto primitivo, incluidas las vetas e incrustaciones rojizas de hierro, de las estalactitas y estalagmitas tratadas. Al eliminar también los restos minerales degradados, deja la superficie pétreo con su composición original de carbonatos observándose un efecto de “pulido químico”.

8. El crecimiento de la microflora necesita, además de condiciones ambientales adecuadas, puntos de anclaje donde fijarse. Al haberse “pulido” la superficie tratada, esta microflora no se asentará de nuevo hasta que las futuras reacciones de descarbonatación produzcan las microcavidades, con lo cual el proceso de limpieza propuesto consigue también retardar la colonización de nueva microflora.

## 5. Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto de referencia UE02-A06, Programa Universidad-Empresa, Universidad del País Vasco, y por el Excelentísimo Ayuntamiento de Karrantza (Bizkaia).

## 6. Referencias

- Ariño, X., Saiz-Jiménez C. 1996. Biological diversity and cultural heritage. *Aerobiologia* 12: 279-282.
- Cigna, AA. 1993. Environmental management of tourist caves: the example of Grotta di Castellana and Grotta Grande del Vento, Italy. *Environmental Geology* 21: 173-180.
- Cigna, AA. 1983. The criterium of visitors capacity of commercial caves. *Proceedings of the International Meeting on the Show Caves and their problems*. Hellenic Speleological Society, 124.
- Edwards, H.G.M., Jorge-Villar, S.E., Jehlicka, J., Munshi, T. 2005. FT-Raman spectroscopic study of calcium-rich and magnesium-rich carbonate minerals. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 61(10): 2273-2280.
- Faimon, J., Štelcl, J., Kubešová, S., Zimák, J. 2003. Environmentally acceptable effect of hydrogen peroxide on cave “lamp-flora”, calcite speleothems and limestones. *Environmental Pollution* 122: 417-422.
- Groth, I., Vettermann, R., Schuetze, B., Schumann, P., Saiz-Jimenez, C. 1999. Actinomycetes in karstic caves of northern Spain (Altamira and Tito Bustillo). *Journal of Microbiological Methods* 36: 115-122.
- Hoyos, M., Soler, V., Cañaveras, J.C., Sánchez-Moral, S., Sanz-Rubio, E. 1998. Microclimatic characterization of a karstic cave: human impact on microenvironmental parameters of a prehistoric rock art cave (Candamo Cave, northern Spain). *Environmental Geology* 33(4): 231-242.
- Hoyos, M., Soler, V. 1998. La cueva de Nerja (Málaga): ejemplo de degradación microambiental. In: Fortea, JF. (Ed.) *La protección y conservación del arte rupestre paleolítico*. Servicio de Publicaciones del Principado de Asturias, Oviedo, 95-107.
- Les, J., Malanda, R., Otero, V. 2005. *Estudio del microclima de la Cueva de Pozalagua (Bizkaia). Período Junio de 2004 a Junio de 2005*. Sociedad de Ciencias Espeleológicas Alfonso Antxia, 76p.
- Madariaga, J.M., Angulo, M., Martínez-Arkarazo, I. 2004. Investigación preliminar sobre el crecimiento y tratamiento del musgo en la Cueva de Pozalagua. UDPS Departamento de Química Analítica EHU-UPV.
- Tatár, E., Mihucz, V., Zámbo, L., Gasparics, T. Zárny, G. 2004. Seasonal changes of fulvic acid, Ca and Mg concentrations of water samples collected above and in the Béke Cave of the Aggtelek karst system (Hungary). *Applied Geochemistry* 19: 1727-1733.
- Villar, E., Fernández, PL., Gutiérrez, I. Quindos, LS., Soto, J. 1986. *Influence of visitors on carbon dioxide concentrations in Altamira Cave*. *Trans Br Cave Res Assoc* 13: 21-23.
- Villar, E., Bonet, A., Diaz-Caneja, B. et al. 1984. *Ambient temperature variations in the Hall of Paintings of Altamira cave due to the presence of visitors*. *Trans Br Cave Res Assoc* 11: 99-104.
- Young, G., Jin, S., Jung, S. 2003. Black carbon pollution of speleothems by fine urban aerosols in tourist caves. *American Mineralogist*, 68: 1872-1878.