

---

Anita Petrović, Dragan Jevtić, Jelena Lukić

## Mikroflora Petničke pećine

---

*Mikrobiološka istraživanja zemljišta i voda Petničke pećine, koja su obahvatala brojnost bakterija i kvasaca u tlu i brojnost pojedinih grupa bakterija u vodi, izvedena su tokom leta 2000. Korišćene su standardne mikrobiološke metode. Ukupan broj bakterija u zemljištu iznosio je preko  $10^7$  bakterija po gramu na svim lokalitetima. Konstatovano je prisustvo roda *Bacillus* na svim lokalitetima izuzev Medvede dvorane. Kvasci su prisutni sa redom veličine  $10^4$  jedinki po gramu zemljišta. U vodama je ustanovljeno prisustvo svih ispitivanih grupa bakterija (heterotrofne, oligotrofne, aerobne mezofilne i koliformne) na svim lokalitetima osim u prokapsnim vodama.*

---

### Uvod

Svaka pećina pokazuje osobine zatvorenog ekosistema koji, u slučaju Petničke pećine, uključuje i vodene elemente. Objedinjavanjem rezultata o brojnosti različitih mikroorganizama u zemljištu i vodi možemo dobiti sumarnu sliku o mikrosvetu jednog takvog ekosistema.

Mikroflora zemljišta, kao i vode, sastoji se od algi, bakterija, gljiva, protozoa i drugih mikroorganizama. Njihov broj u zemljištu zavisi od stepena kontaminacije fekalijama, tipa zemljišta i njegovih fizičkih osobina. Konkretno, mikroorganizama najmanje ima u glinovitom zemljištu (Pyatkin, Krivoshein 1987). Pećinsko zemljište nije rastresito, uglavnom je glinovito i odlikuje se slabom kapilarnom propustljivošću. Fizička svojstva ovog zemljišta, u kombinaciji sa hemijskim faktorima (sastav zemljišta) otežavaju rast i razvoj mikroorganizama.

Sastav mikroflоре vode i brojnost organizama u njoj zavisi od stepena zagađenosti i mogućnosti samoprečišćavanja otpadnih voda koje dospevaju do rečnih korita. U zavisnosti od stepena zagađenosti broj bakterija kreće se od svega nekoliko desetina (zone koje se odlikuju čistom vodom) do preko milion jedinki po mililitru (zone siromašne kiseonikom i bogate organskim materijama (Pyatkin, Krivoshein 1987). Kvalitet vode može se odrediti prisustvom *E. Coli*.

---

Anita Petrović (1983), Aleksinac, Lole Ribara 38, učenica 2. razreda Gimnazije u Aleksincu

Dragan Jevtić (1984), Novi Sad, Bulevar Jovana Dučića 13, učenik 1. razreda Gimnazije "Jovan Jovanović Zmaj" u Novom Sadu

Jelena Lukić (1982), Beograd, Vinogradski venac 4/8, učenica 3. razreda XIII beogradske gimnazije

MENTOR:

Tatjana Berić, Biološki fakultet u Beogradu

Petnička pećina se nalazi na 7.5 km jugoistočno od Valjeva i spada u red značajnih pećina Srbije. Nastala je u krečnjacima ladinskog karsta srednjeg trijasa. To je pećina razgranatog tipa i sastoji se iz više celina, dvorana, suženja i pećinskih kanala. U donjoj potkapini pećine, na 215 m nadmorske visine, nalazi se vrelo kraškog tipa iz kojeg ističe reka Banja (Stanković 1998). Mikrosvet ove pećine nije detaljnije proučavan. Ranija istraživanja mikroflore vrela Banje prisustvo kolimorfni bakterija (Ivanović 1993).

Cilj ovog rada su mikrobiološka istraživanja tla i voda Petničke pećine. Istraživanja zemljišta obuhvatala su brojnost bakterija i kvasaca na lokalitetima različitih karakteristika i izolovanja *Bacillus* spp. iz tih uzoraka. Mikrobiološka analiza vode reke Banje, prokapnih voda i jezerske vode pećine rađena je sa ciljem da se ispita broj i raznovrsnost bakterija zastupljenih u vodi, jer one predstavljaju indikatore zagađenja različitim otpadnim vodama. Određivan je ukupan broj aerobnih mezofilnih bakterija (potencijalni patogeni), broj heterotrofnih bakterija, broj oligotrofnih bakterija i najverovatniji broj koliformnih bakterija.

## Materijal i metode

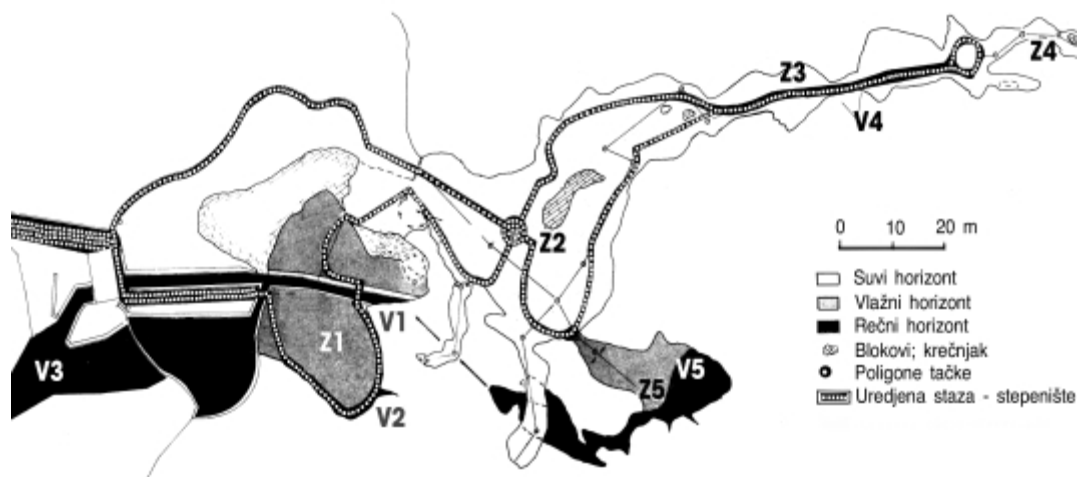
U zavisnosti od raznolikosti životnih uslova prisutnih na različitim mestima u pećini, odabrano je pet različitih lokaliteta (slika 1): Banjska dvorana (Donja pećina), zatim Koncertna dvorana, Medveđa dvorana, Kanal sa ambisom i Aždajina dvorana (Gornja pećina).

### Opis lokaliteta

Lokaliteti na kojima su uzeti uzorci tla:

Z1. *Banjska dvorana* (Donja pećina). Ulaz u Donju pećinu ima oblik raznostranog trougla, čija je osnova 13.6 m, a visina 9 m. Tavanica i desni zid izgrađeni su od krečnjaka, a levi zid od krečnjačkih blokova, drobine i rečnog nanosa. Iz krečnjačke stene izbija jako pećinsko vrelo (Lazarević 1988). Kako je Donja pećina obrušavanjem tavanice odvojena od Gornje pećine, u njoj su fizičko-hemijske osobine potpuno različite od onih u Gornjoj pećini. Ima više svetlosti, strujanje vazduha je jače, zemljište je vlažnije, dok je temperatura vazduha (samim tim i zemljišta) neznatno viša. Uzorkovanje u Banjskoj dvorani obavljeno je 5. jula u 12 časova. Izmerena temperatura zemljišta iznosi 21.8°C.

Z2. *Koncertna dvorana*. Koncertna dvorana je nepravilnog kružnog oblika. Pod je glinovit, prosušen, ređe vlažan. Svetlost (pa i vazduh) prodiru kroz dva otvora relativno velikih dimenzija (vigledi). Samim tim i životni uslovi se delimično razlikuju od onih u dubini pećine. Uzorkovanje je vršeno 5. jula u 11:30 časova, i to ispod jednog grebenčića. Izmerena temperatura iznosi 20.4°C



Z3. *Medveđa dvorana*. Pećinski pod je prekriven glinom i ponekim blokom. Uzorkovanje je vršeno baš ovde zbog velike količine guana (izmet slepih miševa) koji prekriva površinski sloj zemljišta, i to 6. jula u 11:30 časova. Izmerena temperatura iznosi 17.5°C

Z4. *Kanal sa ambisom*. Kanal je tesan, uzan i nizak. Kako dalje nije bilo prohodno, uzorak je uzet na samom početku kanala, a okarakterisan je kao najnepristupačnije mesto. Uzorkovanje je vršeno 5. jula u 11:20 časova. Izmerena temperatura iznosi 20.9°C.

Z5. *Aždajina dvorana*. U Aždajinu dvoranu se ulazi iz Koncertne dvorane. Ona je kaskadna, a njen najniži deo je potopljen. Uzorkovanje je vršeno nekoliko metara od jezera, i to 6. jula u 12:30 časova. Izmerena temperatura iznosi 13.5°C.

Lokaliteti na kojima je vršeno uzorkovanje vode:

V1. *Glavno vrelo reke Banje*. Vrelo izbija iz krečnjačke stene u Donjoj pećini. Dno vrela je kamenito i šljunkovito, a okolina je obrasla zeljastom vegetacijom. Uzorkovanje je obavljeno 5. jula u 11:50 časova. Temperatura vode iznosila je 16.9°C, temperatura vazduha iznosila je 20.9°C, pH vrednost 6.8.

V2. *Bočno vrelo*. Nalazi se u Donjoj pećini. Dno bočnog vrela je kamenito i šljunkovito, u okolini je prisutna zeljasta vegetacija. Uzorkovanje je obavljeno 5. jula u 12:00 časova na temperaturi vazduha od 21.8°C. Temperatura vode iznosila je 14.3°C, pH vrednost 7.2.

V3. *Banja 20 m ispod kaskade* (slika 1). Okolinu čine žbunaste i drvenaste biljke, dno je kamenito i šljunkovito. Uzorkovanje je obavljeno 5. jula u 12:10 na temperaturi vazduha od 26.0°C. Temperatura vode iznosila je 15.0°C, pH vrednost 7.3.

Slika 1. Skica Petničke pećine i vrela Banje sa ucrtanim mestima uzorkovanja. (Prema: Lazarević 1988)

Figure 1. Sketch of Petnička cave and the spring of Banja river with inscribed places of sampling

V4. *Medveđa dvorana*. U Medveđioj dvorani, prema Kanalu sa ambisom prikupljeni su uzorci prokapnih voda. Uzorkovanje je vršeno 6. jula od 12:00 do 12:30, na temperaturi vazduha od 17°C.

V5. *Aždajino jezero*. Predstavlja najniži deo kaskadne Aždajine dvorane u koju se ulazi iz Koncertne dvorane. Dno jezera je muljevito. Uzorkovanje je obavljeno 6. jula u 12:30. Temperatura vazduha iznosila je 15.3°C, temperatura vode iznosila je 13.5°C, pH vrednost 7.0.

## Opis metoda

Uzorkovanje tla je vršeno standardnom metodom uzimanja zemljišta (sterilizacija je vršena na licu mesta, a uzorci stavljeni u sterilne bočice). Za sve uzorke napravljena je suspenzija: 5 g zemljišta i 45 mL sterilne destilovane vode (Sarić 1992). Za bakteriološke analize vršeno je razblaživanje suspenzije dodavanjem 0.01 M MgSO<sub>4</sub> radi dobijanja razblaženja od 10<sup>-3</sup> i 10<sup>-5</sup>. Za analize u kojima se određuje brojnost kvasaca razblaženja su pravljena u sterilnoj vodovodnoj vodi. Pri radu sa kvascima korišćena je Czapek-ova hranljiva podloga (za određivanje ukupne brojnosti) i LA (Luria agar) – za eventualnu izolaciju patogenih kvasaca. U podlogu je dodat antibiotik (u ovom slučaju kanamicin) u koncentraciji od 30 mg/L, kako bi se sprečila pojava bakterija na podlozi. Za bakteriološke analize korišćena je podloga za ukupan broj bakterija.

Po 0.1 mL ovih razblaženja (10<sup>-1</sup>, 10<sup>-3</sup> i 10<sup>-5</sup>) je ispipetirano na hranljive podloge, utrljano sterilnim staklenim štapićem i inkubirano. Inkubacija podloga za ukupan broj bakterija vršena je 48 sati na temperaturi od 30°C, dok su Czapek-ove podloge inkubirane 96 sati na temperaturi od 27°C. LA (korišćen za izolaciju patogenih kvasaca) je inkubiran 48 sati na temperaturi od 37°C.

Broj organizama ( $x$ ) po 1 mL rastvora računa se po formuli

$$x = \frac{a}{b \cdot c} \cdot 10$$

gde je  $a$  prosečan broj kolonija po razređenju,  $b$  zapremina zasejanog razređenja, a  $c$  razređenje. Pri računanju broja kvasaca zanemaruju se razređenja uzorka 10<sup>-3</sup> i 10<sup>-5</sup> (suspenzija je previše razređena, tj. broj kolonija na podlogama sa zasejanim koncentracijama 10<sup>-3</sup> i 10<sup>-5</sup> je zanemarljiv i iznosi 0 ili 1).

Posmatranje ćelija kvasaca vršeno je mikroskopom na obojenim preparatima (Harrigan, McCause 1966), gde su se videle okrugle ćelije sa poljcima (tipično za ćelije kvasaca).

Prilikom izolacije bakterija roda *Bacillus* uzorak se zagreva da bi se uništili vegetativni oblici, a ostale samo spore. Kasnija inkubacija u aerob-

nim uslovima dozvoljava umnožavanje bakterija roda *Bacillus* što olakšava izolaciju.

Izolacija čiste kulture se vrši metodom išarane ploče, pri čemu se uzorak zemljišta dodaje u epruvetu sa 3 mL tečne podloge LB (Luria bujon) i inaktivirane (10 minuta) na 80°C. Inkubiranje epruvete traje 48 sati na 30°C ili do pojave rasta. Za izolaciju treba išarati ploču na hranljivom agaru i inkubirati na 30°C 48 sati (ili do pojave rasta). Po završenoj inkubaciji bira se karakteristična kolonija koja se pomeša sa fiziološkim rastvorom na mikroskopskoj pločici, fiksira na plamenu i boji po Gram-u i Schaeffer-Fulton-u (Knežević-Vukčević, Simić 1997). Bojenje spora po Schaeffer-Fulton-u se koristi za dokazivanje prisustva bakterija koje formiraju endospore. Pozitivan nalaz su zeleno obojene spore na mikroskopskom preparatu.

Uzorci vode za bakteriološku analizu uzeti su standardnom metodom uzorkovanja na opisanim lokalitetima. Za bakteriološke analize korišćene su sledeće hranljive podloge: LA (Luria agar), HA (hranljivi agar), FB (podloga za određivanje fakultativnih oligotrofnih bakterija), EA (endogagar), LAP (laktoza andrade peptonska voda). Za bojenje mikroorganizama korišćene su metode bojenja po Gram-u i Schaeffer-Fulton-u.

*Određivanje NBK (najverovatniji broj koliformnih bakterija).* Radi se koliformni test koji se sastoji iz tri dela, s tim da su u ovom radu urađena prva dva dela (A i B), jer su istraživanja na Banji sa kompletnim koliformnim testom radjena više puta i svaki put je ustanovljeno prisustvo *E. coli* (Stanković 1998).

Prethodni test, tj. određivanje NBK (najverovatniji broj koliformnih bakterija) metodom kolimetrije (Knežević-Vukčević, Simić 1997): zasejavano je 5×1 mL, 1×0.1 mL i 1×0.01 mL svakog uzorka u epruvete u kojima se nalazi po 5 mL LAP i Durham-ova cevčica. Inkubacija je vršena u termostatu na 37°C. Rezultati su očitavani nakon 24 h odnosno 48 h. Uz pomoć Swaroop-ove tablice (Fisher and Jates 1963: prema Stanković 1998) dobili smo NBK na osnovu pozitivnih reakcija u epruvetama (fermentacijom laktoze oslobađa se CO<sub>2</sub> koji se sakuplja u Durham-ovim cevčicama i mlečne kiseline koja menja boju podloge u intezivnije crveno).

Potvrđni test se sastoji u zasejavanju sadržaja iz reprezentativne kolimetrijske epruvete sterilnom ezom na EA metodom išarane ploče. Zasejane petri-šolje inkubirane su 24 h na 37° C. Nakon inkubacije odabiraju se izrasle kolonije i prave mikroskopski preparati za bojenje po Gram-u i Schaeffer-Fulton-u.

*Određivanje ukupnog broja aerobnih mezofilnih bakterija (potencijalnih patogena) u uzorku.* Ukupan broj aerobnih mezofilnih bakterija određen je standardnom metodom (utrljavanjem staklenim štapićem). Na LA

podlogu je zasejavano po 0.1 mL za svaki uzorak koncentrovano, i sa razblaženjem  $10^{-2}$  (za lokalitet 3 korišćena su razblaženja  $10^{-2}$  i  $10^{-4}$  kako bi se dobio što manji broj kolonija). Svako razblaženje se zasejava na dve petri šolje. Zasejane podloge se inkubiraju 24 h na  $37^{\circ}\text{C}$ . Ukupan broj aerobnih mezofilnih bakterija ( $x$ ) u jednom uzorku određuje se pomoću formule:

$$x = \frac{S}{R \cdot V},$$

gde je  $S$  – srednja vrednost broja kolonija,  $R$  – razređenje, a  $V$  – zapremina zasejanog uzorka.

*Određivanje broja heterotrofnih bakterija.* Ukupan broj heterotrofnih bakterija u 1 mL uzorka određivan je istom metodom kao i ukupan broj aerobnih mezofilnih bakterija, ali je kao hranljiva podloga korišćen HA i inkubacija je trajala 3 dana na  $25^{\circ}\text{C}$ .

*Određivanje broja oligotrofnih bakterija.* Ukupan broj oligotrofnih bakterija u 1 mL uzorka određivan je istom metodom kao i ukupan broj aerobnih mezofilnih bakterija, ali je kao hranljiva podloga korišćena podloga FB i inkubacija je trajala 3 dana na  $25^{\circ}\text{C}$ .

## Rezultati i diskusija

Zastupljenost bakterija i kvasaca u zemljištu data je u tabeli 1.

Tabela 1. Broj bakterija i kvasaca po gramu svežeg zemljišta

Lokalitet	Bakterije	Kvasci
1	$1.21 \times 10^9$	$5.6 \times 10^4$
2	$3.76 \times 10^8$	$3.2 \times 10^4$
3	$4.10 \times 10^7$	$0.2 \times 10^4$
4	$1.89 \times 10^8$	$0.9 \times 10^4$
5	$1.93 \times 10^8$	$3.3 \times 10^4$

Prilikom posmatranja obojenih preparata dokazano je prisustvo bakterija roda *Bacillus* na svim lokalitetima, sem u Medveđoj dvorani.

Treba napomenuti da je na svim podlogama za kvasce uočeno prisustvo plesni. Ipak, ono nije uticalo na dobijene rezultate, budući da se plesni morfološki razlikuju od kolonija kvasaca, pa im je potreban duži period inkubacije da bi ih u potpunosti prerastle.

Kao što se iz tabele 1 vidi, najviše bakterija i kvasaca je konstatovano u Banjskoj dvorani (lokalitet 1). Pretpostavljamo da su osnovni razlozi za

to viša temperatura, jače strujanje vazduha i velika vlažnost. Najmanje bakterija i kvasaca registrovano je u Medveđoj dvorani (lokalitet 3). Prva pretpostavka bila je da se dobijeni rezultat javio zbog možda niskog pH koji ne pogoduje bakterijama. Međutim, kako se ispostavilo da je i brojnost kvasaca na ovom lokalitetu takođe mala, uzrok za to može biti hemijski sastav zemljišta. Naime, ovo zemljište je bogato guanom.

Uočljiva je i manja brojnost kvasaca na lokalitetu 4 (Kanal sa ambisom) od brojnosti registrovane u Banjskoj, Koncertnoj i Aždajinoj dvorani. Ovo bi se moglo objasniti činjenicom da je na lokalitetu 4, zbog zavučernog položaja, manje strujanje vazduha.

Patogeni kvasci nisu konstatovani. Međutim, kako nismo raspolagali autentičnim metodom za njihovu izolaciju (odnosno, u dostupnoj literaturi nije se nalazio ni jedan protokol za izolaciju patogenih kvasaca), ne može se sa sigurnošću tvrditi da u pećini zaista nema patogenih kvasaca.

Fizički i hemijski parametri uzoraka vode dati su u tabeli 2. Temperatura i pH vrednost prokarnih voda nisu određeni zbog specifičnosti uzorkovanja (voda je u kapima skupljana sa pećinskog nakita).

Tabela 2. Fizički i hemijski parametri uzetih uzoraka vode

Lokalitet	PH vode	Temperatura vode (°C)	Temperatura vazduha (°C)
1	6.8	16.9	20.9
2	12.05	7.2	14.3
3	12.10	7.3	15.0
4	12.00	–	–
5	12.30	7.0	15.3

Tabela 3. Ukupan broj mezofilnih aerobnih, heterotrofnih i oligotrofnih bakterija po mililitru uzorka

Lokalitet	Aerobne mezofilne bakterije	Heterotrofne bakterije	Oligotrofne bakterije
1	$1.0 \times 10^3$	$5.0 \times 10^3$	$2.2 \times 10^4$
2	$1.3 \times 10^4$	$9.0 \times 10^3$	$4.0 \times 10^4$
3	$2.5 \times 10^3$	$2.5 \times 10^4$	$5.0 \times 10^3$
4	$1.1 \times 10^4$	$1.5 \times 10^4$	$2.9 \times 10^4$
5	$2.0 \times 10^3$	$5.0 \times 10^3$	$7.0 \times 10^3$

Tabela 4. NBK po mililitru uzorka prema Swaroop-ovim tablicama

	Lokalitet																																			
	1					2					3					4					5															
	1	1	1	1	.01	1	1	1	1	.01	1	1	1	1	.01	1	1	1	1	.01	1	1	1	1	.01											
Gas	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kisel.	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Broj	$8.8 \times 10^2$					$8.8 \times 10^2$					$1.5 \times 10^3$					$2.4 \times 10^3$					0															

Tabela 5. Rezultati potvrdnog testa

Lokalitet	Endoagar		Bojenje bakterija	
	Pojava kolonija	metalni sjaj	Gramm	Sch.-Fulton
1	+	+	G + štapić	bez spora
2	+	+	G + štapić	bez spora
3	+	+	G + štapić	bez spora
4	+	+	G + štapić	bez spora
5	-	-	-	-

Ukupan broj mezofilnih aerobnih, heterotrofnih i oligotrofnih bakterija dat je u tabeli 3, a najverovatniji ukupan broj kolimorfni bakterija (NBK) procenjen prema Swaroop-ovim tablicama – u tabeli 4. Rezultati pokazuju da su aerobne mezofilne, heterotrofne i oligotrofne bakterije prisutne na svim lokalitetima, a koliformne bakterije na svim lokalitetima osim na Aždajinom jezeru.

Pozitivni rezultati potvrdnog testa (tabela 5) ukazuju na prisustvo kolimorfni bakterija (na petri-šoljama pojavile su se kolonije sa karakterističnim metalno-zelenim sjajem). Mikroskopiranjem, na osnovu bojenja po Gramm-u, dokazano je postojanje G (crvenih) štapića u uzorcima vode koji potiču sa prva četiri lokaliteta. Na osnovu bojenja po Schaeffer-Fulton-u pokazano je da ovi G štapići ne produkuju spore, što najverovatnije znači da je u pitanju *E. coli*.

## Zaključak

Na osnovu dobijenih rezultata zaključeno je da su u zemljištu Petničke pećine bakterije detektovane u velikom broju (preko  $10^7$  bakterija po gramu na svim lokalitetima). Najveća brojnost bakterija je u Donjoj dvo-



rani, a najmanje ih ima u Medvedoj dvorani. U zemljištu sa svih lokaliteta, osim Medvede dvorane, potvrđeno je prisustvo bakterija iz roda *Bacillus*.

Prisutnost kvasaca ustanovljena je na svih pet lokaliteta. Na osnovu njihove brojnosti može se zaključiti da kvasci opstaju u zemljištu Petničke pećine, ali da nisu podjednako zastupljeni u svim njenim delovima. Njihovu brojnost možemo dovesti u vezu sa različitim osobinama zemljišta, ali i sa položajem dvorane, odnosno njenom vezom sa spoljnom sredinom.

U ispitivanim uzorcima vode ustanovljeno je prisustvo heterotrofnih i oligotrofnih bakterija na svim lokalitetima, a njihova brojnost ukazuje na organsko opterećenje vode. Prisustvo koliformnih bakterija ukazuje na fekalno zagađenje vrela Banje i prokapnih voda, što bi moglo da bude posledica izlivanja otpadnih voda iz seoskih domaćinstava, koje veoma lako poniru kroz krečnjak i mogu dospeti do izvora. Međutim, odsustvo ovih bakterija u Aždajinom jezeru, ukazuje da zagađenje vode ovim bakterijama može imati i drugačije poreklo.

---

## Literatura

- Harrigan W.F., McCance M.E. 1966. *Laboratory Methods in Microbiology*. London: Academic Press
- Karakašević B. 1980. *Mikrobiologija i parazitologija*. Beograd: Medicinska knjiga
- Knežević-Vukčević J., Simić D. 1997. *Metode u mikrobiologiji*. Beograd: Biološki fakultet
- Lazarević R. 1988. *Petnička pećina*. Valjevo: Turistički savez
- Pyatkin K., Krivoshein Yu. 1987. *Microbiology*. Moscow: Mir
- Sarić Z. 1991. *Opšta mikrobiologija*. Beograd: Nauka
- Sarić Z. 1992. *Praktikum iz mikrobiologije*. Beograd: Nauka
- Stanković, S. 1998. Distribucija i populaciona dinamika bakterija u izvorskim ekosistemima. Magistarska teza. Biološki fakultet, Beograd

---

Anita Petrović, Dragan Jevtić and Jelena Lukić

## Microflora of Petnička Cave

In this project we have conducted microbiological research of soil and water in Petnička cave. Research and isolation of *Bacillus* spp. from the soil included bacterias and yeasts in the different characteristic localities has been conducted in the summer of 2000. Microbiological analyses of water from Banja river, dripping water and lake Azdajino water within the

cave were carried out with an aim to examine number and diversity of bacterias represented in water, because they are the indicators of polluted waters. Total numbers of aerobic mesophyles (potential patogens), numbers of heterotrophes, numbers of oligotrophes and the most probable numbers of coliforms were determined. Owing to life condition diversity within the cave Petnička, we have selected five localities for both soil and water analyses (Figure 1). Standard microbiological methods were used in all analyses. The genus *Bacillus* was detected in all localities except in Z3, that we proved by colored preparation examining. The highest number of bacterias and yeasts in the loc. Z1 ( $1.2 \times 10^9$  bacterias and  $5.6 \times 10^4$  yeasts). We suppose that the main reasons of such bacteria and yeast distribution are relatively high temperature, stronger air circulation and high moisture. The lowest number of bacterias and yeasts is detected in the loc. Z3 ( $4.1 \times 10^7$  bacterias and  $0.2 \times 10^4$  yeasts). The highest numbers of aerobic mesophyles, heterotrophes and oligotrophes are detevted in the loc V3 ( $2.5 \times 10^3$  and  $2.5 \times 10^4$ ). Olygotrophes are the most numerous in the loc V2 ( $4.0 \times 10^4$ ), and coliphormes in loc V4. Results indicate that aerobic mesophyles, heterotrophes and oligotrophes are present in all localities, except in the loc. V5. Positive results of affirmative test shows the presence of coliforms (colonies with characteristic metal-green shine developed on petri-dishes). We have verified the existence of G (red) batons in water samples which originate from the localities V1 to V4, using Gram method. According to Schaeffer-Fultons method we have showed that G batons were not producing spores which probably means that founded bacteria is *E. coli*. On the basis of gathered results we concluded that in the soil of Petnička cave bacterias are detected in high number (over 107 bacterias x g-1 in the all localities). The highest numbers of bacterias is in the loc. Z1 and the lowest numbers is in the loc. Z3. Presence of genus *Bacillus* bacterias in the soil is proved in all localities except the loc. Z3. The presence of yeasts is detected in all localities. It can be concluded that yeasts exist in soil of Petnička cave, but that they are not equally present in all of its parts. Their numbers can be related to different soil characteristics, but also with position of cave hall, concerning its conection with external enviroment. In studied water samples the presence of heterotrophes and oligotrophes is determined on all localities, and their number shows an organic water pollution. Presence of coliforms indicates fecal contamination in loc. V1 and loc. V4, which could be the consequense of outflow of sewage waters from rural households.

