Sinopfbd, 2026; 11(1): 184-200 https://doi.org/10.33484/sinopfbd.1803432

Sinop Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi
Sinop Uni J Nat Sci
E-ISSN: 2564-7873

https://dergipark.org.tr/tr/pub/sinopfbd

Olası Bir Çamur Volkanı (Düzce, KB-Türkiye) İlişkili Mikrobiyal Toplulukların Moleküler Profili

Burcu OMUZBÜKEN[1], Aslı KAÇAR[1], Murat TOKCAER[2] ve Günay ÇİFCİ[3,4]

How to cite: Omuzbüken, B., Kaçar, A., Tokcaer, M. & Çifçi, G. (2026). Olası bir çamur volkanı (Düzce, KB-Türkiye) ilişkili mikrobiyal toplulukların moleküler profili. *Sinop Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 11*(1), 184-200. https://doi.org/10.33484/sinopfbd.1803432

Open Access

Araştırma Makalesi

Sorumlu Yazar
Burcu OMUZBÜKEN
burcuomuzbuken@gmail.com

Yazarlara ait ORCID
B.O: 0000-0002-6681-7174
A.K: 0000-0002-8705-3695
M.T: 0000-0003-0157-2150
G.Ç: 0000-0002-4380-8056

Geliş Tarihi: 14.10.2025
Kabul Tarihi: 11.02.2026

Özet

Çamur volkanlarının coğrafi oluşumu jeolojik olaylara bağlıdır ve bunların çoğunluğu yakın zamandaki tektonik aktivite alanlarında, özellikle de sıkışma bölgelerinde meydana gelmektedir. Bu alanlarda anaerobik metan oksidasyonunda rol oynayan mikroorganizmalar hakkındaki mevcut bilgi birikimi, yüksek metan ve sülfat konsantrasyonlarının arke ve bakteri sintrofik ilişkilerinin yüksek aktivitesini desteklediği metan sızdıran ortamların çalışmalarına dayanmaktadır. 2022 yılında Düzce ilinde (Türkiye) gerçekleşen Ml=6.0 büyüklüğündeki depremden sonra gözlenen olası bir çamur volkanında mikrobiyolojik toplulukların araştırılması amacıyla çalışma planlanmıştır. Bu kapsamda, Düzce ilinde olası bir çamur volkanının başlangıç aşamasının araştırılmasına yönelik olarak, 2023 yılı Kasım ayında çamur ve su örnekleri toplanmıştır. Çalışmada mikrobiyal çeşitliliğin ve bolluğun belirlenmesinde; BACT, ARC, ANME-1, MCRA, SRB2, DSS ve DBB gruplarına ait gen bölgeleri Real time quantitative PCR (qPCR) ile belirlenmiştir. En yüksek bakteri bolluğu ($1.52x10^{10}$ gen kopya sayısı/gr) çamur örneğinde gözlenmiştir. En düşük yoğunluğa sahip grup su örneğinde *Desulfobulbus* ($2.49x10^{2}$ gen kopya sayısı/mL) olarak saptanmıştır. Düzce ili çamur volkanında yürütülen bu çalışma, arke ve bakteri gruplarının varlığı ve bolluğunun araştırıldığı, ülkemizde karasal bir ortamda varlığı bilinen bir çamur volkanında gerçekleştirilen ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır. Filogenetik analizler, radyoizotop ölçümleri, lipit analizleri ve izotopik araştırmalar gibi ileri düzey analizlerle, karasal çamur volkanlarının oluşumu, yapısı ve mikrobiyal çeşitliliği daha anlaşılır olabilecektir.

Anahtar Kelimeler: Arke, bakteri, çamur volkanı, Düzce, mikrobiyal bolluk

Molecular Profiling of Microbial Communities Associated with a Potential Mud Volcano (Düzce, NW-Türkiye)

[1]Dokuz Eylül Üniversitesi, Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Enstitüsü, Deniz Bilimleri Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

Abstract

The geographic distribution of mud volcanoes is contingent upon geological processes, with the majority occurring in regions of recent tectonic activity, particularly within compressional zones. The current understanding of microorganisms involved in the anaerobic oxidation of methane in these settings is largely derived from studies of methane seep environments, where high concentrations of methane and sulfate sustain the high activity of syntrophic archaeal and bacterial consortia. This study

[2]Dokuz Eylül Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Jeoloji Mühendisliği Bölümü, İzmir, Türkiye

[3] Dokuz Eylül Üniversitesi, Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Enstitüsü, Deniz Teknolojisi Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

[4] Gazhidratek Alternatif Enerjiler, Teknopark İzmir, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, İzmir, Türkiye

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

was designed to investigate the microbial communities within a potential mud volcano observed following the Ml=6.0 earthquake that occurred in Düzce Province, Türkiye, in 2022. In this context, mud and water samples were collected in November 2023 to characterize the initial stage of a potential mud volcano. To determine microbial diversity and abundance, gene regions specific to the BACT, ARC, ANME-1, MCRA, SRB2, DSS, and DBB groups were quantified using Real-Time Quantitative PCR (qPCR). The highest bacterial abundance (1.52×10^{10} gene copies g^{-1}) was observed in the mud sample. Conversely, the lowest abundance was recorded for the *Desulfobulbus* group (2.49×10^{2} gene copies mL^{-1}) in the water sample. This research represents the first investigation in Türkiye to assess the presence and abundance of archaeal and bacterial groups in a potential mud volcano located in an onshore setting. The mechanisms of formation, structural characteristics, and microbial diversity of terrestrial mud volcanoes may be further elucidated using advanced techniques such as phylogenetic analysis, radioisotope measurements, lipid biomarker analysis, and isotopic investigations.

Keywords: Archaea, bacteria, mud volcano, Düzce, microbial abundance

Giriş

Çamur volkanizması enerji kaynağı keşfi, sismik aktivite ve sera gazlarının atmosfere salınımı vb., açısından önemli etkileri olan yerkabuğunun en ilgi çekici araştırma alanlarından birini temsil etmektedir [1, 2]. Çamur volkanlarının coğrafi oluşumu jeolojik olaylara bağlıdır, bunların çoğunluğu yakın zamandaki tektonik aktivite alanlarında, özellikle de sıkışma bölgelerinde meydana gelmektedir [3, 4]. Karasal çamur volkanları, tektonik basınç ve derin yeraltından gelen sıvılar tarafından yönlendirilen benzersiz yapılardır [4]. Ancak bu yapılar, mutlaka doğal oluşumlar olmayıp, Planke ve ark. [5] ve Mazzini ve Etiope [2] tarafından belirtildiği üzere, insan aktivitelerince (sondaj, kazı vb.) de tetiklenebilir. Örneğin, Davies ve ark. [6] yapmış olduğu araştırma sonucunda, karasal Lusi çamur volkanının (Endonezya) sondaj aktiviteleri ardından oluştuğu raporlanmıştır. Aynı zamanda, tarımsal sulama kuyularının varlığı da çamur volkanı oluşumunu tetikleyici faktör olabilir [7]. Çalışmalar, karasal çamur volkanlarından kaynaklanan metan emisyonlarının hem durgun hem de püskürme evrelerinde atmosfere önemli bir girdi oluşturduğunu ortaya koymaktadır [3, 4, 8, 9]. Bu nedenle küresel metan bütçesine ve dolayısıyla sera etkisine de önemli ölçüde katkıda bulunabilirler [10]. Karasal çamur volkanları; çamur, su ve gazın yüzeye taşınmasıyla sonuçlanan derin tortu katmanlarındaki yüksek basınç ile ortaya çıkmaktadır [4]. Dimitrov [3] ve Kopf [4] çalışmalarında, çamur volkanlarının sıklıkla aktif fay zonlarında geliştiğini göstermiştir. Ancak çamur volkanı oluşumu için depremin hemen öncesinde aktif olması gerekmemekte olup, Istadi ve ark. [11] uzun süreli tektonik hazırlık süreçlerinin önemini de vurgulamıştır. Tahlatli ve ark. [12] Azerbaycan çamur volkanları ile sismisite ilişkisini incelemiştir. Yaptıkları araştırmada, Azerbaycan'daki bazı çamur volkanları birkaç günde oluştuğu, ancak binlerce yıldır aktif olmaya devam ettiklerini bildirmişlerdir. Çamur ve sıvı emisyon yapıları, küçük çamur havuzlarından, konik grifonlara kadar değişen morfolojik çeşitlilik göstermektedir. Karasal çamur volkanlarından kaynaklanan breş, sıvı ve gaz emisyonları jeolojik olarak derin yer altı petrol ve doğal gaz rezervuarlarına ve derin biyosfere bağlıdır. Ancak bu ortamlardan elde edilen mikrobiyolojik veriler hakkındaki bilgiler sınırlıdır. Metan emisyonunun önemli doğal kaynakları olarak da bilinen karasal çamur volkanlarında yaşayan mikroorganizmalar ise büyük ölçüde aydınlatılamamıştır [1]. Denizaltı çamur volkanlarında yer alan mikrobiyal topluluklar, sucul ekosistemlerin küresel metan döngüsü üzerindeki önemli çevresel etkisi nedeniyle görece daha kapsamlı bir şekilde incelenmiştir [13-22]. Karasal çamur volkanlarındaki mikrobiyal çeşitlilik ile ilgili ise oldukça kısıtlı sayıda araştırma bulunmaktadır. Dünya genelinde; Romanya, İtalya, Azerbaycan, Tayvan, Çin, Trinidad ve Rusya'daki karasal çamur volkanları, mikrobiyal topluluk yapıları ve bollukları

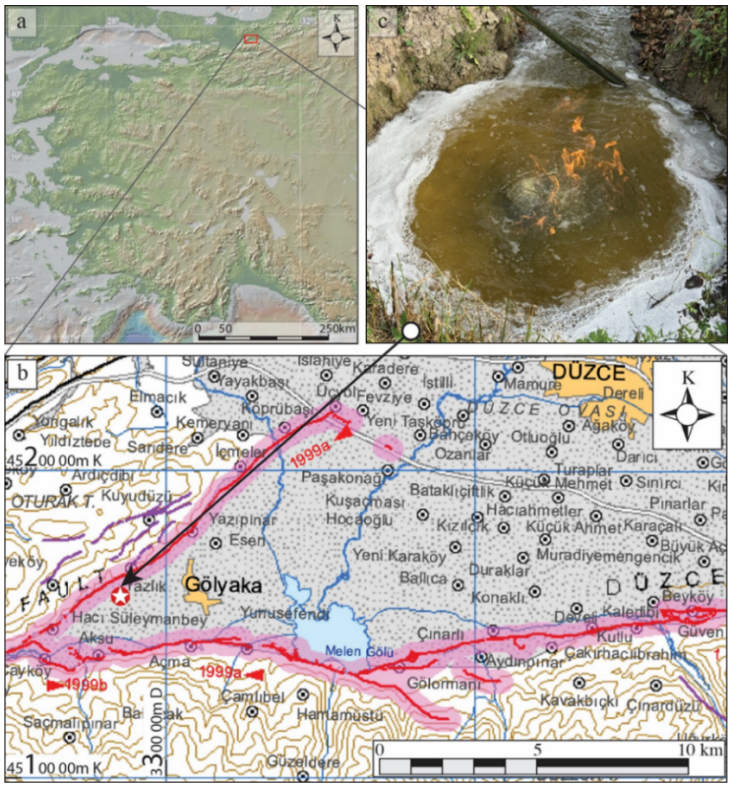
açısından araştırılmıştır [10, 23, 24-31]. Mikroorganizmaların araştırılmasında kullanılan Metagenomik yaklaşımlar ise, karasal çamur volkanlarının prokaryotik çeşitliliğini keşfetmek için yakın zamanda uygulanmaya başlanmıştır [32, 33]. Çamur volkanları, atmosfere metan akışının önemli bir kaynağı olarak kabul edildiğinden [3, 9], metan ve kükürt döngüsünde mikrobiyolojik çalışmalar, özellikle sülfata bağlı anaerobik metan oksidasyonunda yer alan prokaryotlar üzerine olmaktadır [10, 24, 28, 34]. Karasal çamur volkanlarından *Deltaproteobacteria* ve *Clostridia*'ya ait birkaç bakteri türü izole edilmiştir [10, 35]. Literatürde incelenen bu yapılarda yer alan mikrobiyal toplulukların belirgin özelliği, anaerobik metan oksitleyen arkelerin (ANME) varlığıdır. ANME'lerin bolluğu farklı ekosistemlerde değişkenlik göstermekle birlikte genellikle 10^5 ila 10^7 gen kopya sayısı/gr arasında değiştiği ve toplam mikrobiyal popülasyonun %1-20'sini oluşturduğu da ifade edilmektedir [20, 32]. Kültüre edilemeyen bu mikroorganizmalar, Genus Tabanlı DataBase (GTDB)'da "Euryarchaeota" şubesine [36] "Halobacteriota" şubesine aittir ve üç filogenetik grupla temsil edilir: a ve b alt grupları olan ANME-1 (Candidatus Methanophagales), a, b, c, d alt grupları olan ANME-2 ve ANME-3. Monofiletik değildirler: ANME-2 ve ANME-3, Methanosarcinales'e aitken ANME-1'in ayrı bir derin filogenetik kolu vardır [37, 38]. ANME tarafından gerçekleştirilen anaerobik metan oksidasyonunun (AMO) biyolojik mekanizmaları ve biyokimyasal yolları hala tam olarak ortaya çıkarılamamıştır. Farklı ANME grupları bir araya gelerek, metan oksidasyonunun çeşitli elektron alıcılarının indirgenmesiyle gerçekleştirdikleri ifade edilmektedir [1, 39- 43]. Jeokimyasal modelleme çalışmaları, mikrobiyal solunumun yüzeyde baskın olarak sülfat indirgemesi ile gerçekleştiği ortaya koymuştur. Bu alanlara, her iki bileşiğin de eşit molar miktarlarda tüketildiği 'sülfat-metan geçiş bölgesi' denir [44-45]. Gaz/sıvı sızıntıları, püskürmeler ve gaz hidrat yapısındaki değişikliklerin bir sonucu olarak çamur volkanlarının mikrobiyal topluluklarının yapısında ve işleyişinde zamansal ve mekansal değişimlerin gözlemlenebileceği öngörülmektedir [17]. Anaerobik metan oksidasyonunda rol oynayan mikroorganizmalar hakkındaki mevcut bilgiler, yüksek metan ve sülfat konsantrasyonlarının arkelerin ve bakterilerin sintrofik ilişkilerini desteklediği yönündedir [45]. Yapılan araştırmalarda, sülfat indirgenmesi ve anaerobik metan oksidasyonunun olduğu konsorsiyumlarda, ANME-1 ve ANME-2 arke grupları ile SEEP-SRB1 veya SEEP-SRB2 (Desulfobacterota) sülfat indirgeyen bakteri gruplarının ilişki içinde olduğu bildirilmiştir. Sonuç olarak, bu tür habitatlardaki mikroorganizmaların yalnızca küçük bir kısmı klasik mikrobiyolojik tekniklerle tanımlanabilmiştir. Araştırmalar, toplam mikrobiyal popülasyonun yalnızca %1 ila %5 arasında değişen küçük bir kısmının başarıyla sınıflandırılabildiğini göstermektedir. Bununla birlikte, çamur volkanlarında mikrobiyal çeşitliliği belirlemede 16S rRNA korunan gen bölgelerini hedefleyen moleküler biyolojik yöntemlerin uygulamasının önemi vurgulanmaktadır. Mevcut çalışmada Düzce ili Sarıdere-Gölyaka'da (Türkiye) merkez üssünde 22 Kasım 2022 tarihinde gerçekleşen Ml=6.0 büyüklüğündeki depremden sonra gözlenen olası bir çamur volkanında mikrobiyolojik analizler yapılmıştır. Çamur volkanları genellikle episodik aktivite gösterir. Yıllar boyunca aralıklarla çamur, gaz ve su püskürtebilir, bu da yapının sürekli büyümesine neden olur. Türkiye'de deprem sonrası karasal ortamda gözlenen ilk çamur volkanının başlangıç aşamasından toplanan çamur ve su örneklerinde bulunan mikrobiyal çeşitlilik ve bolluk moleküler metot olan gerçek zamanlı kantitatif (qPCR) ile ilk kez bu çalışmada değerlendirilmiştir.

Materyal ve Metot

Çalışma Alanı ve Örnekleme

Düzce Ovası, Kuzey Anadolu Fay Zonu'nun (KAFZ) K71°D doğrultulu Karadere Segmenti ile D-B doğrultulu Düzce Segmentleri arasında gelişmiş bir fay kaması havzadır. Düzce Havzası ve çevresinde Prekambriyen'den günümüze kadar değişen yaş aralığına sahip kaya birimleri ve çökeller yüzeylemektedir. Çalışma alanında Mesozoyik-Senozoyik yaşlı birimler, Senoniyen yaşlı volkanitler ve sedimanter kayalar, üst Kretase yaşlı kırıntılılar ve karbonatlar, üst Kretase-Eosen yaşlı kırıntılılar ve

karbonatlar, Paleosen yaşlı karasal kırıntılılar, Eosen yaşlı volkanitler ve sedimanter kayalar, alt-orta Eosen yaşlı kırıntılılar ve karbonatlar ile benzer yaşlı neritik kireçtaşlarından oluşur. Bu birimler Düzce Havzası'nın çevresini kuşatmış olmakla beraber, KAFZ'nun güney ve kuzey bloğunda yüzeyleyen aynı birimlerin kısmen farklı litolojik özellikler sergilediği görülmüştür [46]. Pliyo-Kuvaterner yaşlı birimleri genel olarak iri taneli havza kenarı ve ince taneli havza içi çökeller olarak iki gruba ayrılabilir. Çoğunlukla alüvyon yelpazesi çökelleri, döküntü çökelleri ve akarsu sekisi çökellerinden oluşan havza kenarı çökelleri, genişlikleri 1-5 km arasında değişen kuşaklar halinde uzanır. Çoğunlukla, eğim atım bileşenine sahip doğrultu atımlı faylarla kesilmiş olan bu yelpazelerin oluşturduğu dağ eteği düzlükleri basamaklı bir morfoloji sunar. Havza içi birimler ise başlıca menderesli nehir, taşkın ovası, bataklık ve göllerde çökelmiş olan, göreceli olarak daha ince taneli sedimanlardır [47]. Bu çökellerin büyük bölümü Holosen istifleri şeklindedir. Havza içlerinde etek, akarsu ve göl çökelleri yanal ve düşey yönde geçiş göstererek hızla depolanırken, kıyı kuşağında delta, plaj ve rüzgâr egemen tortullar çökelimlerini sürdürmektedir. Geçiş ortamlarını oluşturan lagüner ortamlar, siltlenme süreciyle karalaşma eğilimindedir. Bölgesel tektonizma sonucu erozyonla deşilerek oluşan vadi sistemleri ise akarsu süreçlerinde gelişen tortullardan oluşmaktadır. KAFZ boyunca birkaç alanda gözlenen travertenler Kuvaterner boyunca oluşumunu sürdürmektedir [48]. Çamur volkanları genellikle tekil ve belirli bir noktadan yüzeye ulaşan akışkan çıkışlarıyla karakterize edilen jeolojik yapılardır. Bu çalışmada incelenen alan, çamur volkanının başlangıç aşamasında olması nedeniyle, yalnızca sınırlı bir noktada gazlı su çıkışı göstermektedir. Dolayısıyla örnekleme stratejisi, mevcut aktif çıkış noktasına odaklanmıştır. Çalışmada mikrobiyolojik parametreleri araştırmak amacıyla; Düzce ilinde (KB-Türkiye)'de (40°46'30"K, 30°58'01"D) olası bir çamur volkanının başlangıç aşamasından 2023 yılı Kasım ayında 500 gr çamur ve 500 mL su örnekleri toplanmış olup, örnekleme alanında gazlı su çıkışı gözlemlenmiştir. Steril falcon tüplerine alınan örnekler +4°C'de saklanmış ve örneklemeden hemen sonra laboratuvara soğuk zincirde taşınmıştır. Şekil 1'de örnekleme alanı gösterilmektedir.



Şekil 1. *Düzce ili olası çamur volkanı örnekleme alanının haritası (a- b) [49] ve gazlı su çıkışı olan nokta (c) (40°46'30"K, 30°58'01"D)*

Mikrobiyal Örneklerin Toplam DNA İzolasyonu

Çalışmada 500 mL'lik şişelere alınan çamur volkanı örneklerinden, prosedüre göre 0.25 mL su örneği ve 0.25 gram çamur örnekleri tartılmıştır. Her bir örneğin ayrı ayrı toplam genomik DNA izolasyonu, DNeasy PowerSoil DNA İzolasyon (Qiagen) Kiti ile kullanılarak elde edilmiştir. DNA izolasyon prosedürü, ticari kitte belirtildiği üzere, DNA izolasyonu amacıyla optimize edilerek ve minör modifikasyonlarla uygulanmıştır. İzole edilen DNA'nın miktar ve kalitesini artırmak amacıyla gerçekleştirilen modifikasyon -80°C'de 5 dakika, ardından +65°C' de 3 dakika inkübasyon olarak uygulanmıştır. İzolasyon sonucu elde edilen DNA, ileri analizler gerçekleştirilene kadar 20°C'de tutulmuştur. DNA örnekleri NanoDrop ile ölçülen, A260/280 nm'de absorbanslarına göre kalite ve miktarları açısından kontrol edilmiştir. Sediment örneklerinden elde edilen DNA, A260/A280 oranının ≈ 1.8 olmasıyla çevresel örnekler için kabul edilebilir ve yüksek saflık göstermiştir. Su örneklerinden elde edilen DNA ise daha yüksek saflık düzeyine (A260/A280 ≈ 2.0) sahiptir.

Real Time PCR Analizi İçin Primerlerin Sentezi

Çalışma alanına özgü, özellikle anaerobik metan oksitleyen arkeleri ve sülfat indirgeyen bakteri gruplarını kapsayacak şekilde Grup-spesifik primer setleri sentezlettirilmiştir (Sentromer DNA Teknolojileri Ltd. Şti. İstanbul). Çalışmada, arke gruplarının bolluklarının tespiti için; arke (ARC), metanojen (MCRA), anaerobik metan oksitleyici arke (ANME-1); bakteri bolluklarının belirlenmesi için ise, bakteri (BAC), sülfat indirgeyici bakteri (SRB2), Desulfosarcina (DSS) ve Desulfobulbus (DBB) gen bölgeleri olmak üzere dizayn edilen primerler kullanılmıştır [50-54] (Tablo 1).

Tablo 1. *Mikrobiyolojik analizlerde kullanılan grup-spesifik primer setleri*

Grup	Primerler	Kaynaklar
ANME-1	F: AGG TCC TAC GGG ACG CAT R: GGT CAG ACG CCT TCG CT	[54]
MCRA	F: GGT GGT GTM GGD TTC ACM CAR TA R: CGT TCA TBG CGT AGT TVG GRT AGT	[50]
SRB2	F: ACT TGA GTA CCG GAG AGG GA R: CCT AGT GCC CAT CGT TTA GG	[53]
DSS	F: ACT TGA GTA TGG GAG AGG GAA G R: ACC TAG TGT TCA CCG TTT ACT GC	[52]
DBB	F: GCT TGA GTA TGG GAG GGG A R: CAC CTA GTT CTC ATC GTT TAC AGC	[52]
BACT	F: CGG TGA ATA CGT TCY CGG R: GGW TAC CTT GTT ACG ACT T	[51]

Real Time qPCR Analizi

Çalışma alanındaki örneklerdeki mikrobiyal bolluk, Real time qPCR (Roche LightCycler 96 cihazı) ile belirlenmiştir. Roche LightCycler FastStart DNA Master SybrGreen I kiti, kantitatif PCR analizlerinde üretici talimatlarına uygun olarak kullanılmıştır. Reaksiyon karışımı 20 µl son hacimde hazırlanarak deneyler gerçekleştirilmiştir [51, 54]. Amplifikasyon PCR ürünleri DNA'yı temizleme kiti (High Pure PCR Product Purification Kit, Roche) ile saflaştırılmıştır. DNA'nın kalitesi ve konsantrasyonu spektrofotometre (Nanodrop 2000c, Thermo Scientific, ABD) ile ölçülmüştür ve amplikonlar da %1.5 agar jel elektroforezi ile beklenen boyut açısından incelenmiştir. Konsantrasyonlar, aşağıdaki formül kullanılarak DNA'nın kopya sayısına dönüştürülmüştür.

$$Gen\ bölgesi\ kopya\ sayısı\ \left(kopya\ \frac{sayısı}{\mu l}\right) = \frac{DNA\ konsantrasyonu\ \mu g/\mu l\ x\ 6.0233\ x\ 10^{23}}{DNA\ boyutu\ (baz\ çifti)\ x\ 660\ x\ 10^{6}}, \quad (1)$$

Standart eğri yöntemi her bir amplikonun bilinen konsantrasyonlarının (10^1 ila 10^{10} amplikon aralığı) bir seyreltme serisinin her iki gen bölgesi için eşik döngüsü (*Ct*) değerlerine dayanarak oluşturulur. Standart eğrilerden elde edilen sonuçlar, her seyreltmedeki *Ct* değerleri ile hedef amplikonların bilinen konsantrasyonunun log10'u arasında bir grafik göstermiştir. Her amplikonun kopyasından elde edilen *Ct* değerleri, olası çamur volkanı su ve çamur örneğindeki ARC, MCRA, ANME-1, BAC, SRB2, DSS ve DBB gen bölgeleri kopya sayısını hesaplamak için kullanılmıştır. Standart eğri denklemi, *Ct* ile x (log kopya sayısı) arasındaki ilişkiyi tanımlamaktadır. Miktar tayinlerinin gerçekleştirilmesi için her gen bölgesinde standart eğri hazırlanması gerekmektedir. Protokol her grup için ANME-1, MCRA, SRB2, DSS ve DBB primerleri ile optimize edilmiştir. İlk denatürasyon adımı 95°C'de 5 dakika boyunca 1 döngü olarak ayarlanmıştır. Daha sonra, amplifikasyon adımı 95°C'de 10 saniye, ardından 53°C'de 15 saniye amplifikasyon ve 72°C'de 15 saniye uzama olmak üzere toplam 45 döngü gerçekleştirilmiştir. Protokol bir eritme adımı ile sonlandırılmıştır. 95°C'de 65°C/saniye hızında 5 saniyelik bir periyot ve ardından döngü boyunca sinyal edinimi için 97°C'de 1 saniyelik bir periyot içeren tek bir döngü gerçekleştirilmiştir. Protokolün son aşaması soğutma adımı olup, 40°C'de 10 saniyelik bir süre boyunca tek bir döngü gerçekleştirilmiştir. ARC ve BACT protokolü ise, 95°C'de 5 dakika boyunca gerçekleştirilen ilk bir denatürasyon adımını içerir. Daha sonra, amplifikasyon adımı 95°C'de 10 saniye boyunca gerçekleştirilmiştir, ardından 50°C'de 15 saniye boyunca amplifikasyon ve 72°C'de 11 saniye boyunca uzatma olmak üzere toplam 45 döngü gerçekleştirilmiştir. Protokol bir eritme adımıyla sonlandırılmıştır. 95°C'de 65°C/sn hızında 5 saniyelik bir periyottan oluşan tek bir döngü gerçekleştirilerek, ardından döngü boyunca sinyal edinimi için 97°C'de 1 saniyelik bir periyot uygulanmıştır. Protokolün son aşaması soğutma adımıdır. 40°C'de 10 saniyelik bir süre boyunca tek bir döngü gerçekleştirilmiştir. Tüm deneyler çift tekrarlı olarak yapılmıştır. Primerlerin kantifikasyonundan sonra, veriler gram çamur başına gen kopya sayısı ve mililitre başına gen kopya sayısı olarak ifade edilmiştir. Hedef genler için qPCR standart eğrisi Y- kesişim, eğim, etkinlik ve R^2 değerleri Tablo 2'de verilmiştir. Eritme eğrisi (melt curve) analizlerinde her hedef gen için tek ve özgül bir pik elde edilmiş, non-spesifik amplifikasyon veya primer-dimer oluşumuna dair ek pik gözlenmemiştir. Negatif kontrol (NTC) reaksiyonlarında amplifikasyon sinyali saptanmamıştır. Ct değerleri sediment örneklerinin tamamında 16–27 aralığında yoğunlaşırken, su örneklerinde daha geç döngülerde 30–35 aralığında kalmıştır.

Tablo 2. *Hedef genler için qPCR standart eğrisi parametreleri (Y-kesişim, eğim, etkinlik ve R²)*

Hedef Gen	Y - Kesişim	Eğim	Etkinlik	R^2
ARC	38.01	-3.40	1.93	0.9994
ANME-1	37.60	-3.32	2.00	0.9981
MCRA	38.10	-3.26	2.00	0.9977
BACT	38.25	-3.32	2.00	0.9999
SRB2	37.83	-3.32	2.00	0.9989
DSS	37.30	-3.34	1.99	0.9999
DBB	37.82	-3.25	2.04	0.9929

Bulgular ve Tartışma

Düzce ilinde bulunan olası bir çamur volkanının başlangıç aşamasında alınan çamur ve su örneklerinde gerçekleştirilen mikrobiyal profilin ve bolluğun ortaya çıkarılması amaçlı yapılan Real-Time qPCR deneylerinin sonuçlarına bakıldığında; bu ortamda bakteriyal bolluğun arke bolluğundan daha fazla olduğu ortaya konmuştur. Çamur örneğinde tespit edilen en yüksek düzey 1.52×10^{10} gen kopya sayısı/gr ile BACT geninde gözlenmiştir. Bu gen bölgesinin ortamdaki genel bakteri çeşitliliği miktarını yansıttığından yüksek düzeyde olması beklenen bir bulgudur. En düşük mikrobiyal bolluk ise su örneğinde DBB (2.49×10^2 gen kopya sayısı/mL) gen bölgesine ait olarak tespit edilmiştir. Metanojenez

yolunu tersine çevirerek üretilen metanı ortadan kaldırdığı tahmin edilen bir süreçten sorumlu olan ANME-1 gen bölgesine ait çamur örneğinde 3.95 x 10^5 gen kopya sayısı/gr bulunmuşken, su örneğinde ANME-1 tespit edilememiştir. ANME-1 ile ilişkili olan SRB2 geni 5.98 x 10^6 gen kopya sayısı/gr olarak çamur örneğinde bulunurken, yine su örneğinde tespit edilememiştir. Biyojenik metan üretimine işaret eden, yani metanın üretiminden sorumlu gen bölgesi olan MCRA yine çamur örneğinde 3.54 x 10^8 gen kopya sayısı/gr olarak ölçülürken su örneğinde tespit edilememiştir. Olası çamur volkanının başlangıç aşamasında alınan çamur ve su örneklerinden elde edilen mikrobiyal veriler, genel olarak değerlendirildiğinde, metan ve sülfür ilişkili bakteri ve arke gruplarının çevrede önemli düzeylerde bulunduğunu göstermektedir (Tablo 3-4, Şekil 2-3).

Tablo 3. *Bakterilerin ve sülfat indirgeyici bakteri gruplarının (BACT,SRB2, DSS, DBB) gen kopya sayılarının sonuçları*

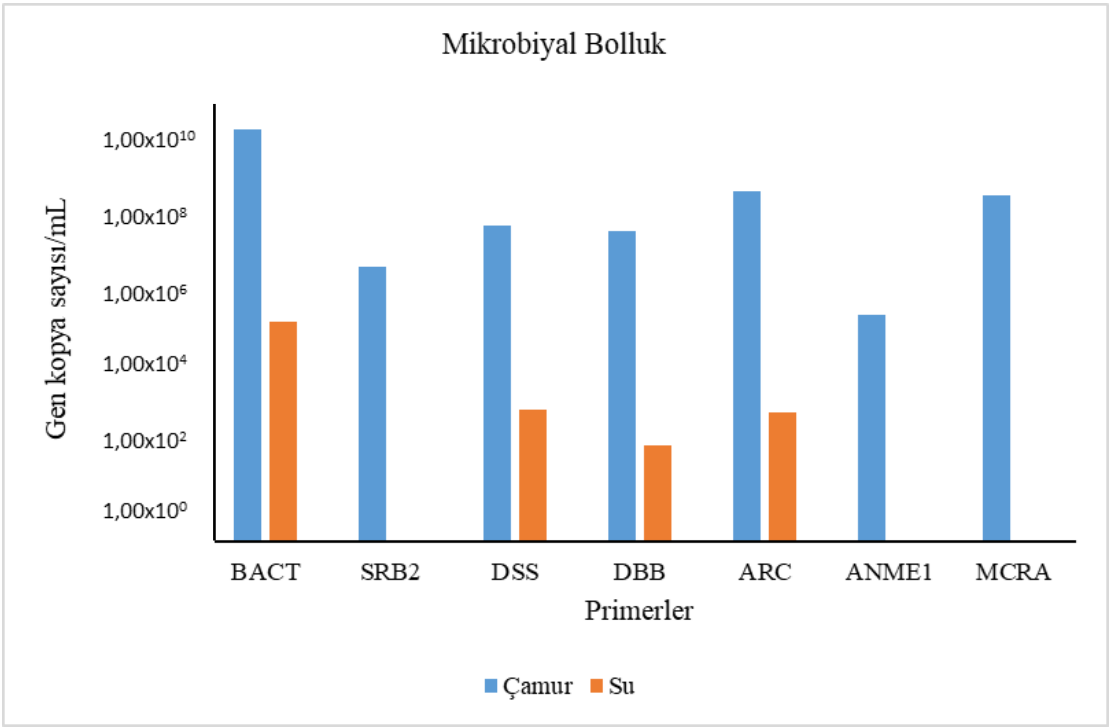
Örnek	**BACT**	**SRB2**	**DSS**	**DBB**
Çamur (gen kopya sayısı/ gr)	1.52 x 10^{10}	5.98 x 10^6	6.46 x 10^7	4.81 x 10^7
Su (gen kopya sayısı/mL)	2.75 x 10^5	-*	1.89 x 10^3	2.49 x 10^2

*-: Tespit edilemedi

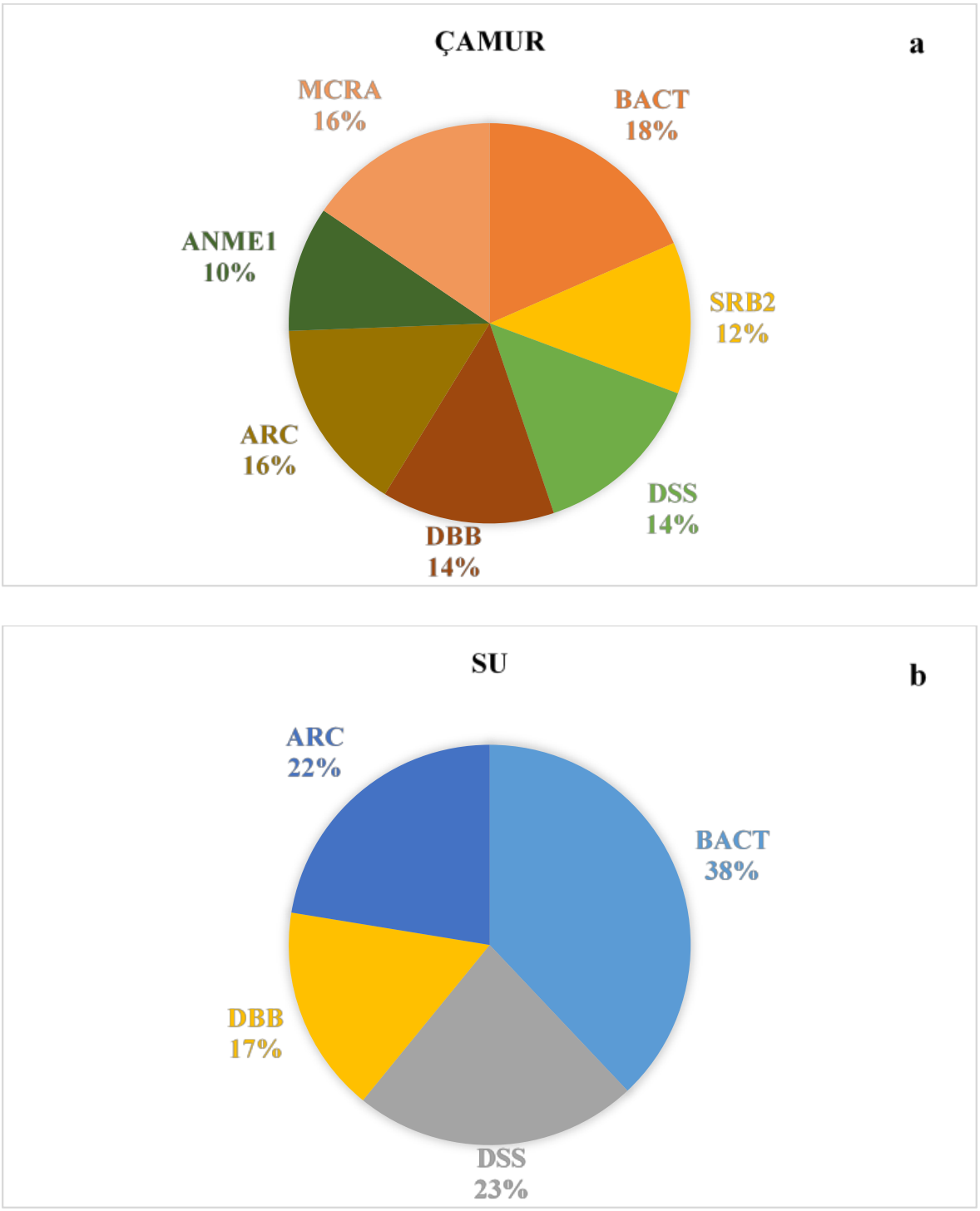
Tablo 4. *Arkelerin (ARC, ANME-1, MCRA) gen kopya sayılarının sonuçları*

Örnek	**ARC**	**ANME-1**	**MCRA**
Çamur (gen kopya sayısı/gr)	4.50 x 10^8	3.95 x 10^5	3.54 x 10^8
Su (gen kopya sayısı/mL)	1.62 x 10^3	-*	-*

*-: Tespit edilemedi



Şekil 2. *Çamur ve su örneklerinde Real time qPCR kullanılarak mikrobiyal topluluk analizi sonuçlarının karşılaştırılması.*



Şekil 3. *Çamur (a) ve su (b) örneklerinde incelenen mikrobiyal bolluğun oranları.*

Çalışmamızdan elde edilen verilere göre, çamur örneklerinde maksimum organizma bolluğu açısından 10^{10} gen kopya sayısı/gr ile bakteri gruplarının baskınlığı görülürken, arkeler için bu durum 10^{8} gen kopya sayısı/gr ile temsil edilmektedir. Su örneklerinde ise ml başına maksimum gen kopya sayısı bakteriler için 10^{5} seviyelerindeyken, arkelerde 10^{3} gen kopya sayısı düzeyindedir. Çamur örneklerinde MCRA gen bolluğunun (3.54×10^{8} gen kopyası/gr) arke genleri ile benzer büyüklükte olması, arke topluluğunun büyük bir bölümünün metan metabolizmasıyla ilişkili olduğunu göstermektedir. Buna karşın, anaerobik metan oksitleyici arke grubu olan ANME-1'in görece düşük bollukta bulunması (3.95×10^{5} gen kopyası/gr), çalışılan çamur volkanının erken gelişim evresinde olduğunu ve AMO

konsorsiyumunun henüz tam olarak baskınlaşmadığını düşündürmektedir. Su örneklerinde ANME-1 ve MCRA genlerinin tespit edilememesi, metanla ilişkili arkeal süreçlerin büyük ölçüde çamur matriksi ile sınırlı olduğunu düşündürmektedir. Merkel ve ark., [1]'nın yapmış olduğu benzer bir çalışmada ise, Rusya'da Karabetova Gora karasal çamur volkanında toplam bakteri bolluğu 3.03 x 10^8 gen kopya sayısı/ml, ANME-3 grubu organizmaları ise 8.85 x 10^7 gen kopya sayısı/ml olarak ölçülmüştür. Schulze-Makuch ve ark., [31] ise Trinidad'daki çamur volkanı örneklerinde organizma bolluğunun 1.12 x 10^5 ile 7.3 x 10^7 gen kopya sayısı/gr aralığında olduğunu belirlemişlerdir. ANME grubunun karasal bir ortamda varlığını bildiren ilk çalışma, Alain ve ark., [10] tarafından 2006 yılında Romanya'daki Karpat Dağları'ndaki çamur volkanlarında yürütülen araştırmadır. Bu araştırmada elde edilen mikrobiyal çeşitlilik analizleri sonuçlarının, bizim çalışmamızda da elde ettiğimiz sonuçlarla benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Alain ve ark., [10] bakteri bolluğunu 3.4–5.1 x 10^8 gen kopya sayısı/gr ve arke bolluğunu ise 0.25–1.6 x 10^6 gen kopya sayısı/gr kuru ağırlık olarak tespit etmişlerdir. Bugüne kadar ANME'lerin anoksik metan çıkışı açısından zengin deniz sedimentlerinde var olduğu biliniyorken, Romanya Karpat Dağlarındaki çamur volkanında yürütülen araştırma sonucunda, karasal çamur volkanlarındaki metabolik süreçlerde de görev aldıkları kanıtlanmıştır. Ayrıca, 16S rDNA dizilerinin filogenetik analizleri, genellikle metan döngüsü (metanojenler, aerobik ve anaerobik metanotroflar), kükürt döngüsü (sülfat indirgeyiciler) ve hidrokarbonların anaerobik bozunmasıyla bağlantılı gruplarla ilişkili bakteri ve arke varlığını göstermişlerdir. Çamur volkanları, çevrelerindeki ekosistemler ile karşılaştırıldığında mikrobiyal toplulukları araştırmak için benzersiz bir ekosistemi temsil etmektedir. Bu benzersizlik, çamur volkanı oluşumunun, genellikle birkaç kilometre derinliğe kadar uzanan çatlaklar aracılığıyla derin rezervuarlardan gelen sıvıların, gazların ve tortuların taşınımıyla sıkı bir şekilde bağlantılı olmasından kaynaklanmaktadır [2]. Bu nedenle, çamur volkanları yer kabuğunun derinlerinde yer alan mikrobiyal toplulukları tanımlayabilmek için de doğrudan ve etkili bir yol sağlar [2, 26, 34]. Fiziko-kimyasal özelliklerindeki farklılıkları nedeniyle, güçlü redoks gradyanları üreterek, çevresindeki ortamlardan farklı mikrobiyal çeşitliliğe sahip [27, 29], jeolojik olarak üretilen gazlar ve sıvılar sayesinde dünya genelinde çamur volkanları benzersiz biyolojik sıcak noktalardır (*Hot spots*). Son yıllarda yapılan çalışmalar, çamur volkanlarının atmosferik metanın önemli bir kaynağı olduğunu ve toplam jeolojik metan emisyonlarının yaklaşık %30'unu yayarak [30, 55] küresel ısınmaya önemli ölçüde katkıda bulunduğunu göstermektedir [27, 56]. Ancak, metanın önemli bir kısmı yüzey tortularında tutulur ve metanotrofik mikroorganizmalar tarafından tüketilerek atmosfere salınması önlenir [32, 57], bu sayede bu mikroorganizmalar küresel metan döngüsünde hayati bir rol oynar [1, 58]. Metan oksitleyen mikroorganizmalar Atmosfere salınan metanın kalan %30'u fosil organik materyalin termojenik ayrışmasından jeolojik metan ve topluca doğal gaz olarak bilinen diğer gazlara dönüşür [57, 59]. Çamur volkanındaki koşullar organizmalar için son derece ekstremdir. Bu bölgelerde yaşayan mikrobiyal topluluklar ağırlıklı olarak yoğun ve çeşitli ekstremofilik mikroorganizmalardan oluşmaktadır [2, 60] ve bu organizmalar yüksek sıcaklık, basınç, pH ve tuzluluğa karşı geniş tolerans gösterebilmektedir [61]. Genetik çeşitlilikleri ve işlevsellikleri nedeniyle dikkate değer metabolik potansiyele de sahiptirler [1]. Her ne kadar kısıtlı sayıda gerçekleştirilen çalışmalar, karasal çamur volkanlarındaki mikrobiyal toplulukların bileşimini ve dağılımını göstermiş olsa da [1, 32, 33, 62], bu mikrobiyal toplulukların dağılımı, işlevsel çeşitliliği ve topluluğu günümüzde tam olarak ortaya konulmamıştır [63]. Çalışmamızda, çamur ve su örnekleri arasındaki farklılıklara karşın, analiz edilen tüm çamur örnekleri, sülfat indirgeyici bakterileri (SRB2, DSS ve DBB), anaerobik metan oksitleyen (ANME-1) arkeleri ve metanojenik arkeleri (MCRA) içermektedir. Bunlar muhtemelen sığ yeraltı suyuna maruz kalmadan önce derin yeraltı kaynağından gelen orijinal sıvıları temsil etmektedir. Bu grup mikroorganizmaların ayrıca Barents Denizi'ndeki Haakon Mosby Çamur Volkanı'nda da bulunduğu Niemann ve ark., [13] ile Lösekann ve ark., [14] tarafından yapılan araştırmaların sonucunda da bildirilmiştir. Sülfat indirgeyici bakteriler ayrıca güney Tayvan'daki karasal bir çamur volkanı sahasında

[64] ve metanotrofik arkeler ile çeşitli Proteobacteria ve Actinobacteria grupları da dünyanın çeşitli yerlerindeki diğer çamur volkanı sahalarında tespit edilmiştir [65, 66]. Diğer araştırmacılarında elde ettiği bulgularda çamur volkanlarında baskın olarak; mevcut mikroorganizmaların metanotrofik arkeler ve sülfat indirgeyici bakteriler olduğu görülmektedir [13, 64-66]. Asif ve ark., [63] 2024 yılında yayınladıkları çalışmada, Tayvan'ın Kaohsiung şehrinin Yanchao Bölgesi'nde bulunan, sürekli olarak koni şeklinde, küçük boyutlu dairesel yapılar püskürten karasal bir çamur volkanı olan Yeni Yangnyu Çamur Volkanı'nda inceleme yapmışlardır. Buna göre, Proteobacteria ağırlıklı bir bakteriyal topluluk yapısı ile sülfat metabolizmasıyla ilişkili mikrobiyal toplulukların baskınlığını rapor etmişlerdir. Chen ve ark., [67] ise, gaz çıkışı olan karasal bir çamur volkanında metan - sülfür döngüsünü incelemek üzere, ANME-1, ANME-2 ve ANME-3 ün bolluğunu çevresel koşullarla ilişkilendirerek sonuçları raporlamışlardır. Ayrıca anaerobik metan oksidasyonu ve metanojenezis arasındaki ilişkiyi incelemiş, SRB grubu (özellikle Desulfosarcina / Desulfobulbus) ve bunların ANME ile konsorsiyum kurduklarını tespit etmişlerdir. Bizim gerçekleştirdiğimiz çalışmada da hedeflenen ANME-1, MCRA, SRB2, DSS ve DBB gen bölgeleri, Chen ve ark., [67] çalışmasında tanımlanan metan–sülfür döngüsünün temel mikrobiyal bileşenleriyle örtüşmekte olup, karasal çamur volkanının başlangıç evresinde bu konsorsiyumun oluşumuna dair erken sinyallerin değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır. Çamur volkanlarının büyüme ve gelişim süreçleri ilerledikçe yeni gaz ve akışkan çıkış noktalarının oluşması beklenmektedir. İncelenen sistemin başlangıç aşamasında olması nedeniyle, örnekleme yalnızca mevcut aktif noktaya odaklanabilmiştir. Bu durum, mikrobiyal toplulukların mekânsal heterojenliğinin tam olarak temsil edilmesini sınırlandırmaktadır. Bununla birlikte, elde edilen bulgular, karasal bir çamur volkanında mikrobiyal çeşitliliğin erken evrelerine ilişkin bir kesit sunmaktadır. Gelecekte yapılacak çalışmalar, sistemin farklı gelişim evrelerinde ve artan çıkış noktaları boyunca gerçekleştirilecek örneklemelerle mikrobiyal dağılımın mekânsal ve zamansal değişimini daha kapsamlı şekilde ortaya koyabilecektir.

Sonuç

Düzce ili Sarıdere-Gölyaka'da gerçekleşen Ml=6.0 büyüklüğündeki depremden sonra gözlenen olası çamur volkanından alınan örneklerde yapılan çalışmanın sonuçlarına bakıldığında; sülfat indirgeyen bakterilerin ve metanojenik arkeler ile anaerobik metan oksitleyen arkelerin aynı ortamda bir arada olduğunu göstermektedir.

- Sülfat indirgeme süreçleriyle ilişkili mikrobiyal topluluklar bu çamur volkanında aktif olarak yer almaktadır. Anoksik alanlarda gözlenecek olan mikrobiyal çeşitlilik olası çamur volkanında açıkça hakim olarak tespit edilmiştir.
- Genel olarak, farklı sülfat indirgeyici bakteri gruplarının ve anaerobik metan oksitleyici arkelerin metan sızıntıları ve çamur volkanlarının karasal ortamlarında anaerobik metan oksidasyon sürecine dahil olduğu gösterilmiştir.
- Tüm bu nedenlerle, bu olgunun karasal ortamlarda meydana gelmesi, olası çamur volkanı gelişimine dair kanıt sağlayabilmektedir.

Mevcut literatür araştırıldığında, bu çalışma arke ve bakteri grupları açısından ülkemizde karasal olası bir çamur volkanında gerçekleştirilen ilk çalışmadır. ANME'lerin anoksik metan açısından zengin deniz sedimentlerinde yoğunlukla tespit edildiği literatürde mevcutken, bu deniz dışı yaşam alanında ANME'nin tespiti, sülfat ve metanın önemli miktarlarda mevcut olduğu diğer karasal çamur volkanlarında da bulunabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, arkeal (ARC, MCRA, ANME-1) ve bakteriyel (BAC, SRB2, DSS ve DBB) gen bölgelerinin qPCR ile varlık ve bolluklarının irdelenmesi, Remizovschi ve Carpa [68] tarafından da vurgulanan biyolojik veri boşluğunu doldurmakta, karasal bir çamur volkanının başlangıç evresinin araştırılmasında destekleyici bir yaklaşım sunmaktadır. Bu veriler ışığında öncelikle; i) karasal çamur volkanlarının gelişiminin orta ve büyük ölçekli depremler ve fay

hatları ile ilişkisi, ii) karasal çamur volkanlarının çevresindeki denizel kökenden beslenip beslenmediğinin daha detaylı araştırılması gerekmekte olup, filogenetik analizler, radyoizotop, lipit analizleri ve izotopik araştırmalar gibi ileri analizler ile karasal çamur volkanlarının oluşumu, yapısı ve mikrobiyal çeşitliliği daha anlaşılır olabilecektir.

Beyanlar

Teşekkür: Bu çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi FHD-2023-3225 koduyla desteklenmiştir. Proje ekibine ayrıca teşekkür ederiz.

Fon/Finansman bilgileri: Çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi FHD-2023-3225 koduyla desteklenmiştir.

Etik Kurul Onayı ve İzinler: Çalışma, etik kurul izni veya herhangi bir özel izin gerektirmemektedir.

Çıkar çatışmaları/Çatışan çıkarlar: Yazarlar arasında herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

Yazar(lar)ın Katkısı: Burcu Omuzbüken %30, Aslı Kaçar %30, Murat Tokcaer %20, Günay Çifci %20 katkı sağlamıştır.

Yapay Zekâ Kullanımı: Yazarlar makalenin hazırlanmasında/oluşturulmasında yapay zekâ (YZ) araçlarını kullanmadıklarını beyan etmişlerdir.

Kaynaklar

[1] Merkel, A. Y., Chernyh, N. A., Pimenov, N. V., Bonch-Osmolovskaya, E. A., & Slobodkin, A. I. (2021). Diversity and metabolic potential of the terrestrial mud volcano microbial community with a high abundance of Archaea mediating the anaerobic oxidation of methane. *Life*, *11*(9), 953. https://doi.org/10.3390/life11090953

[2] Mazzini, A., & Etiope, G. (2017). Mud volcanism: An updated review. *Earth-Science Reviews*, *168*(1), 81–112. https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2017.03.001

[3] Dimitrov, L. I. (2002). Mud volcanoes – the most important pathway for degassing deeply buried sediments. *Earth-Science Reviews*, *59*(1–4), 49–76. https://doi.org/10.1016/S0012-8252(02)00069-7

[4] Kopf, A. J. (2002). Significance of mud volcanism. *Reviews of Geophysics*, *40*(2), 1–52. https://doi.org/10.1029/2000RG000093

[5] Planke, S., Svensen, H., Hovland, M., Banks, D. A., & Jamtveit, B. (2003). Mud and fluid migration in active mud volcanoes in Azerbaijan. *Geo-Marine Letters*, *23*, 258–268. https://doi.org/10.1007/s00367-003-0152-z

[6] Davies, R. J., Swarbrick, R. E., Evans, R. J., & Huuse, M. (2006). Birth of a mud volcano: East Java, 29 May 2006. *Geological Society of America Today*, *17*(2), 4–9. https://doi.org/10.1130/GSAT01702A.1

[7] Manga, M., Brumm, M., & Rudolph, M. L. (2009). Earthquake triggering of mud volcanoes. *Marine and Petroleum Geology*, *26*(9), 1785–1798. https://doi.org/10.1016/j.marpetgeo.2009.01.019

[8] Milkov, A. V., Sassen, R., Apanasovich, T. V., & Dadashev, F. G. (2003). Global gas flux from mud volcanoes: a significant source of fossil methane in the atmosphere and the ocean. *Geophysical Research Letters*, *3*, 1037–1040. https://doi.org/10.1029/2002GL016358

[9] Etiope, G., & Milkov, A. V. (2004). A new estimate of global methane flux from onshore and shallow submarine mud volcanoes to the atmosphere. *Environmental Geology*, *46*(8), 997–1002. https://doi.org/10.1007/s00254-004-1085-1

[10] Alain, K., Holler, T., Musat, F., Elvert, M., Treude, T., & Kruger, M. (2006). Microbiological investigation of methane- and hydrocarbon-discharging mud volcanoes in the Carpathian Mountains, Romania. *Environmental Microbiology*, *8*(4), 574–590. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00922.x

[11] Istadi, B. P., Pramono, G. H., Sumintadireja, P., & Alam, S. (2009). Modeling study of growth and potential geohazard for LUSI mud volcano: East Java, Indonesia. *Marine and Petroleum Geology*, *26*(9), 1724–1739. https://doi.org/10.1016/j.marpetgeo.2009.03.006

[12] Tahlatli, N. E., Bakdamirova, G. İ., & Yusifova, T. C. (2023, 23–26 Mayıs). 2010–2020 yılları arasında Azerbaycan'da çamur volkanları etrafında gerginlik vaziyetinin değerlendirilmesi [Konferans bildirisi]. *The International Scientific and Practical Conference, Haydar Aliyev and Azerbaijan Oil Strategy: Advances in Oil and Gas Geology and Geotechnologies*, Bakü, Azerbaycan.

[13] Niemann, H., Lösekann, T., De Beer, D., Elvert, M., Nadalig, T., Knittel, K., Amann, R., Sauter, E. J., Schlüter, M., Klages, M., Foucher, J. P., & Boetius, A. (2006). Novel microbial communities of the Haakon Mosby mud volcano and their role as a methane sink. *Nature*, *443*, 854–858. https://doi.org/10.1038/nature05227

[14] Lösekann, T., Knittel, K., Nadalig, T., Fuchs, B., Niemann, H., Boetius, A., & Amann, R. (2007). Diversity and abundance of aerobic and anaerobic methane oxidizers at the Haakon Mosby Mud Volcano, Barents Sea. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(10), 3348–3362. https://doi.org/10.1128/AEM.00016-07

[15] Omoregie, E. O., Mastalerz, V., De Lange, G., Straub, K. L., Kappler, A., Røy, H., Stadnitskaia, A., Foucher, J. P., & Boetius, A. (2008). Biogeochemistry and community composition of iron- and sulphur-precipitating microbial mats at the Chefren mud volcano (Nile Deep Sea Fan, Eastern Mediterranean). *Applied and Environmental Microbiology*, *74*, 3198–3215. https://doi.org/10.1128/AEM.01751-07

[16] Pachiadaki, M. G., Lykousis, V., Stefanou, E. G., & Kormas, K. A. (2010). Prokaryotic community structure and diversity in the sediments of an active submarine mud volcano (Kazan mud volcano, East Mediterranean Sea). *FEMS Microbiology Ecology*, *72*, 429–444. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00857.x

[17] Pachiadaki, M. G., Kallionaki, A., Dahlmann, A., De Lange, G. J., & Kormas, K. A. (2011). Diversity and spatial distribution of prokaryotic communities along a sediment vertical profile of a deep-sea mud volcano. *Microbial Ecology*, *62*, 655–668. https://doi.org/10.1007/s00248-011-9855-2

[18] Lazar, C. S., Parkes, R. J., Cragg, B. A., L'Haridon, S., & Toffin, L. (2011). Methanogenic diversity and activity in hypersaline sediments of the centre of the Napoli mud volcano, Eastern Mediterranean Sea. *Environmental Microbiology*, *13*(8), 2078–2091. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02425.x

[19] Lazar, C. S., Parkes, J. R., Cragg, B. A., L'Haridon, S., & Toffin, L. (2012). Methanogenic activity and diversity in the centre of the Amsterdam Mud Volcano, Eastern Mediterranean Sea. *FEMS Microbiology Ecology*, *81*(2), 243–254. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01375.x

[20] Ruff, S. E., Biddle, J. F., Teske, A. P., Knittel, K., Boetius, A., & Ramette, A. (2015). Global dispersion and local diversification of the methane seep microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*, 4015–4020. https://doi.org/10.1073/pnas.1421865112

[21] Coelho, F. J., Louvado, A., Domingues, P. M., Cleary, D. F., Ferreira, M., Almeida, A., Cunha, M. R., Cunha, Â., & Gomes, N. C. (2016). Integrated analysis of bacterial and microeukaryotic communities from differentially active mud volcanoes in the Gulf of Cadiz. *Scientific Reports*, *6*(1), 35272. https://doi.org/10.1038/srep35272

[22] Hoshino, T., Toki, T., Ijiri, A., Morono, Y., Machiyama, H., Ashi, J., Okamura, K., & Inagaki, F. (2017). Atribacteria from the subseafloor sedimentary biosphere disperse to the hydrosphere through submarine mud volcanoes. *Frontiers in Microbiology*, *8*(1), 1135. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01135

[23] Slobodkina, G. B., Merkel, A. Y., Novikov, A. A., Bonch-Osmolovskaya, E. A., & Slobodkin, A. I. (2020). *Pelomicrobium methylotrophicum* gen. nov., sp. nov. A moderately thermophilic, facultatively anaerobic, lithoautotrophic and methylotrophic bacterium isolated from a terrestrial mud volcano. *Extremophiles*, *24*, 177–185. https://doi.org/10.1007/s00792-019-01145-0

[24] Wrede, C., Brady, S., Rockstroh, S., Dreier, A., Kokoschka, S., Heinzelmann, S.M., Heller, C., Reitner, J., Taviani, M., Daniel, R., & Hoppert, M. (2012). Aerobic and anaerobic methane oxidation in terrestrial mud volcanoes in the Northern Apennines. *Sedimentary Geology*, *263*, 210–219. https://doi.org/10.1016/j.sedgeo.2011.06.004

[25] Green-Saxena, A., Feyzullayev, A., Hubert, R. J., Kallmeyer, J., Krueger, M., Sauer, P., Schulz, H. M., & Orphan, V. J. (2012). Active sulphur cycling by diverse mesophilic and thermophilic microorganisms in terrestrial mud volcanoes of Azerbaijan. *Environmental Microbiology*, *14*(12), 3271–3286. https://doi.org/10.1111/1462-2920.12015

[26] Cheng, T. W., Chang, Y. H., Tang, S. L., Tseng, C. H., Chiang, P. W., Chang, K. T., Sun, C. H., Chen, Y. G., Kuo, H. C., Wang, C. H., Chu, P. H., Song, S. R., Wang, P. L., & Lin, H. H. (2012). Metabolic stratification driven by surface and subsurface interactions in a terrestrial mud volcano. *The ISME Journal*, *6*(12), 2280–2290. https://doi.org/10.1038/ismej.2012.61

[27] Wang, P. L., Chiu, Y. P., Cheng, T. W., Chang, Y. H., Tu, W. X., & Lin, L. H. (2014). Spatial variations of community structures and methane cycling across a transect of Lei-Gong-Hou mud volcanoes in eastern Taiwan. *Frontiers in Microbiology*, *5*, 121. https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00121

[28] Yang, H. M., Lou, K., Sun, J., Zhang, T., & Ma, X. L. (2012). Prokaryotic diversity of an active mud volcano in the Usu City of Xinjiang, China. *Journal of Basic Microbiology*, *52*, 79–85. https://doi.org/10.1002/jobm.201100074

[29] Lin, Y. T., Tu, T. H., Wei, C. L., Rumble, D., Lin, L. H., & Wang, P. L. (2018). Steep redox gradient and biogeochemical cycling driven by deeply sourced fluids and gases in a terrestrial mud volcano. *FEMS Microbiology Ecology*, *94*(12), fiy171. https://doi.org/10.1093/femsec/fiy171

[30] Ren, G., Ma, A., Zhang, Y., Deng, Y., Zheng, G., Zhuang, X., Zhuang, G., & Fortin, D. (2018). Electron acceptors for anaerobic oxidation of methane drive microbial community structure and diversity in mud volcanoes. *Environmental Microbiology*, *20*, 2370–2385. https://doi.org/10.1111/1462-2920.14128

[31] Schulze-Makuch, D., Haque, S., Beckles, D., Schmitt-Kopplin, P., Harir, M., Schneider, B., Stumpp, C., & Wagner, D. A. (2020). A chemical and microbial characterization of selected mud volcanoes in Trinidad reveals pathogens introduced by surface water and rain water. *Science of the Total Environment*, *707*, 136087. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136087

[32] Tu, T. H., Wu, L. W., Lin, Y. S., Imachi, H., Lin, L. H., & Wang, P. L. (2017). Microbial community composition and functional capacity in a terrestrial ferruginous, sulfate-depleted mud volcano. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 2137. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02137

[33] Mardanov, A. V., Kadnikov, V. V., Beletsky, A. V., & Ravin, N. V. (2020). Sulfur and methane-oxidizing microbial community in a terrestrial mud volcano revealed by metagenomics. *Microorganisms*, *8*(9), 1333. https://doi.org/10.3390/microorganisms809133

[34] Chang, Y. H., Cheng, T. W., Lai, W. J., Tsai, W. Y., Sun, C. H., Lin, L. H., & Wang, P. L. (2012). Microbial methane cycling in a terrestrial mud volcano in eastern Taiwan. *Environmental Microbiology*, *14*(4), 895–908. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02658.x

[35] Kokoschka, S., Dreier, A., Romoth, K., Taviani, M., Schafer, N., Reitner, J., & Hoppert, M. (2015). Isolation of anaerobic bacteria from terrestrial mud volcanoes (Salse di Nirano, Northern Apennines, Italy). *Geomicrobiology Journal*, *32*(4), 355–364. https://doi.org/10.1080/01490451.2014.940632

[36] Rinke, C., Chuvochina, M., Mussig, A. J., Chaumeil, P. A., Davín, A. A., Waite, D. W., Whitman, W. B., Parks, D. H., & Hugenholtz, P. (2021). A standardized archaeal taxonomy for the Genome Taxonomy Database. *Nature Microbiology*, *6*, 946–959. https://doi.org/10.1038/s41564-021-00918-8

[37] Knittel, K., & Boetius, A. (2009). Anaerobic oxidation of methane: Progress with an unknown process. *Annual Review of Microbiology*, *63*(1), 311–334. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093130

[38] Adam, P., Borrel, G., Brochier-Armanet, C., & Gribaldo, S. (2017). The growing tree of Archaea: New perspectives on their diversity, evolution and ecology. *The ISME Journal*, *11*(11), 2407–2425. https://doi.org/10.1038/ismej.2017.122

[39] Bhattarai, S., Cassarini, C., & Lens, P. N. L. (2019). Physiology and distribution of archaeal methanotrophs that couple anaerobic oxidation of methane with sulfate reduction. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *83*(1), e00074-18.

[40] Raghoebarsing, A. A., Pol, A., Van de Pas-Schoonen, K. T., Smolders, A. J., Ettwig, K. F., Rijpstra, W. I., Schouten, S., Damsté, J. S., den Camp, H. J., Jetten, M. S., & Strous, M. (2006). A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification. *Nature*, *440*, 918–921. https://doi.org/10.1038/nature04617

[41] Beal, E. J., House, C. H., & Orphan, V. J. (2009). Manganese-and iron-dependent marine methane oxidation. *Science*, *325*(5937), 184–187.

[42] Cai, C., Leu, A. O., Xie, G. J., Guo, J., Feng, Y., Zhao, J. X., Tyson, G. W., Yuan, Z., & Hu, S. (2018). A methanotrophic archaeon couples anaerobic oxidation of methane to Fe(III) reduction. *The ISME Journal*, *12*(8), 1929–1939.

[43] Leu, A. O., Cai, C., McIlroy, S. J., Southam, G., Orphan, V. J., Yuan, Z., Hu, S., & Tyson, G. W. (2020). Anaerobic methane oxidation coupled to manganese reduction by members of the Methanoperedenaceae. *The ISME Journal*, *14*(5), 1030–1041. https://doi.org/10.1038/s41396-020-0590-x

[44] Joye, S. B., Boetius, A., Orcutt, B. N., Montoya, J. P., Schulz, H. N., Erickson, M. J., & Lugo, S. K., (2004). The anaerobic oxidation of methane and sulfate reduction in sediments from Gulf of Mexico cold seeps. *Chemical Geology*, *205*(3–4), 219–238. https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2003.12.019

[45] Biddle, J. F., House, C. H., & Brenchley, J. E. (2005). Microbial stratification in deeply buried marine sediment reflects changes in sulfate/methane profiles. *Geobiology*, *3*(4), 287–295.

[46] Bulut Üstün, A., Özata, A., Özerk, O. C., Osmançelebioğlu, R., Esirtgen, T., Kazancı, N., & Gürbüz, A. (2019). *1/250.000 ölçekli Türkiye sıvılaşmaya yatkınlık haritaları Adapazarı (NK 36-13), Ereğli (NK 36-9), Zonguldak (NK 36-10) ve Bolu (NK 36-14) paftaları*. (Türkiye Sıvılaşmaya Yatkınlık Haritaları Serisi No. 1). Maden Tetkik ve Arama Genel Müdürlüğü.

[47] Emre, Ö., Duman, T. Y., Awata, Y., Doğan, A., & Özalp, S. (2000, Eylül 10-15). *Surface ruptures of November 12, 1999 Düzce Earthquake, NW Turkey*. In *XXVII General Assembly of the European Seismological Commission (ESC–2000): Book of Abstracts and Papers* (pp. 247-252). Lisbon, Portugal.

[48] Tokcaer, M. (2024). *23 Kasım 2022 Düzce depremi sonrasında gelişen gazlı su çıkışının kökensel açıdan değerlendirilmesine yönelik ön çalışma* (Proje No: FHD-2023-3225). Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi.

[49] Emre, Ö., Duman, T. Y., & Özalp, S. (2021). *1:250.000 ölçekli Türkiye diri fay haritası serisi: Adapazarı (NK 36-13) paftası* (Türkiye Diri Fay Haritası Serisi No. 14). Maden Tetkik ve Arama Genel Müdürlüğü.

[50] Steinberg, L. M., & Regan, J. M. (2009). mcrA-targeted real-time quantitative PCR method to examine methanogen communities. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*, 4435–4442. https://doi.org/10.1128/AEM.02858-08

[51] Vigneron, A., Cruaud, P., Pignet, P., Caprais, J. C., Cambon-Bonavita, M. A., Godfroy, A., & Laurent, T. (2013). Archaeal and anaerobic methane oxidizer communities in the Sonora Margin cold seeps, Guaymas Basin (Gulf of California). *ISME Journal*, *7*, 1595–1608. https://doi.org/10.1038/ismej.2013.18

[52] Vigneron, A., Cruaud, P., Pignet, P., Caprais, J. C., Gayet, N., Cambon-Bonavita, M. A., Godfroy, A., & Toffin, L. (2014). Bacterial communities and syntrophic associations involved in anaerobic oxidation of methane process of the Sonora Margin cold seeps, Guaymas Basin. *Environmental Microbiology*, *16*, 2777–2790. https://doi.org/10.1111/1462-2920.12324

[53] Timmers, P. H. A., Gieteling, J., Widjaja-Greefkes, H. C. A., Plugge, C. M., Stams, A. J. M., Lens, P. N. L., & Meulepas, R. J. W. (2015). Growth of anaerobic methane-oxidizing archaea and sulfate-reducing bacteria in a high-pressure membrane capsule bioreactor. *Applied and Environmental Microbiology*, *82*, 1286–1296. https://doi.org/10.1128/AEM.03255-14

[54] Timmers, H. A., Welte, C. U., Koehorst, J. J., Plugge, C. M., Jetten, M. S. M., & Stams, A. J. M. (2017). Reverse methanogenesis and respiration in methanotrophic archaea. *Archaea*, *2017*, 1654237. https://doi.org/10.1155/2017/1654237

[55] Ma, K., Ma, A., Zheng, G., Ren, G., Xie, F., Zhou, H., Yin, J., Liang, Y., Zhuang, X., & Zhuang, G. (2021). Mineralosphere microbiome leading to changed geochemical properties of sedimentary rocks from Aiqigou mud volcano, Northwest China. *Microorganisms*, *9*(3), 560. https://doi.org/10.3390/microorganisms9030560

[56] Zhong, S., Zhang, J., Luo, J., Yuan, Y., & Su, P. (2021). Geological characteristics of mud volcanoes and diapirs in the Northern Continental Margin of the South China Sea: implications for the mechanisms controlling the genesis of fluid leakage structures. *Geofluids*, *2021*, 5519264. https://doi.org/10.1155/2021/5519264

[57] Farhan Ul-Haque, M., Crombie, A. T., Ensminger, S. A., Baciu, C., & Murrell, J. C. (2018). Facultative methanotrophs are abundant at terrestrial natural gas seeps. *Microbiome*, *6*(1), 118. https://doi.org/10.1186/s40168-018-0500-x

[58] Webster, G., Cragg, B. A., Rinna, J., Watkins, A. J., Sass, H., Weightman, A. J., & Parkes, R. J. (2023). Methanogen activity and microbial diversity in Gulf of Cadiz mud volcano sediments. *Frontiers in Microbiology*, *14*, 1157337. https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1157337

[59] United States Environmental Protection Agency. (2010). *Methane and nitrous oxide emissions from natural sources* (EPA 430-R-10-001). U.S. Environmental Protection Agency.

[60] Miyake, N., Ishimaru, R., Komatsu, G., & Matsui, T. (2022). Characterization of archaeal and bacterial communities thriving in methane-seeping on-land mud volcanoes, Niigata, Japan. *International Microbiology*, *26*, 191–204. https://doi.org/10.1007/s10123-022-00288-z

[61] Kumar, R., Merugu, R., Mohapatra, S., Sharma, S., & Hemlata. (2022). Extremophiles: Life of microorganisms in extreme environments. In *Extremophiles* (pp. 43–66). CRC Press. https://doi.org/10.1201/9781003014188-3

[62] Huang, Z., Xu, S., Han, Y., Gao, Y., Wang, Y., & Song, C. (2016). Comparative study of Dushanzi and Baiyanggou mud volcano microbial communities in Junggar Basin in Xinjiang. *International Research Journal of Public and Environmental Health*, *11*(3), 244–256. https://doi.org/10.15739/irjpeh.16.031

[63] Asif, A., Koner, S., Chen, J. S., Hussain, A., Huang, S. W., Hussain, B., & Hsu, B. M. (2024). Uncovering the microbial community structure and physiological profiles of terrestrial mud volcanoes: A comprehensive metagenomic insight towards their trichloroethylene biodegradation potentiality. *Environmental Research*, *258*(1), 119457. https://doi.org/10.1016/j.envres.2024.119457

[64] Liu, C. C., Maitya, J. P., Jean, J. S., Sracek, O., Kar, S., & Li, Z. (2011). Biogeochemical interactions among the arsenic, iron, humic substances, and microbes in mud volcanoes in southern Taiwan. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, *46*(11), 1218–1230. https://doi.org/10.1080/10934529.2011.598793

[65] Yakimov, M., Giuliano, L., Crisafi, E., Chernikova, T., Timmis, K., & Golyshin, P. (2002). Microbial community of a saline mud volcano at San Biagio-Belpasso, Mt. Etna (Italy). *Environmental Microbiology*, *4*, 249–256. https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00293.x

[66] Martinez, R. J., Mills, H. J., Story, S., & Sobecky, P. A. (2006). Prokaryotic diversity and metabolically active microbial populations in sediments from an active mud volcano in the Gulf of Mexico. *Environmental Microbiology*, *8*(10), 1783–1796. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01063.x

[67] Chen, J. N., Chiu, Y. P., Tu, T. H., Italiano, F., Wang, P. L., & Lin, L. H. (2024). Variations in microbial community compositions and processes imposed under contrast geochemical contexts in Sicilian mud volcanoes, Italy. *Frontiers in Microbiology*, *15*, 1461252. https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1461252

[68] Remizovschi, A., Carpa, R. (2021). Biologically-oriented mud volcano database: muddy_db. *PeerJ*, *9*, e12463. http://doi.org/10.7717/peerj.12463