



***Pisolithus arrhizus* Ekstraktı Kullanılarak Sentezlenen Titanyum Nanopartikülünün Antimikrobiyal Etkisi\***

Gökçen YUVALI ÇELİK<sup>1</sup>, Dilşad ONBAŞLI<sup>1</sup>, Özge ÖZBAHAR<sup>1</sup>, İsmail ÖÇSOY<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRKİYE

<sup>2</sup>Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRKİYE

\*Sorumlu yazar: Gökçen YUVALI ÇELİK; E-posta: gycelik@erciyes.edu.tr; ORCID:0000-0002-3990-1346  
Atıf yapmak için: Yuvalı Çelik G, Onbaşı D, Özbahar Ö, Öçsoy İ. *Pisolithus arrhizus* ekstraktı kullanılarak sentezlenen titanyum nanopartikülünün antimikrobiyal etkisi. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2019; 16(3): 157-161.

**Özet:** *Pisolithus arrhizus* (Scop.) Rauschert (Basidiomycetes) türü okalıptüs ve çam ağaçlarının birçok türünü çevreleyen kökleri toprakta bulunan bir ektomikorizal mantardır. Bu çalışmada *Pisolithus arrhizus* etanol ekstraktı kullanılarak hazırlanan Titanyum (TiO<sub>2</sub>) nanopartikülünün (NP) farklı patojen mikroorganizmalar üzerinde inhibitör etkisinin tespit edilmesi amaçlanmıştır. Çalışmada hidrotermal yöntem kullanılarak sentezlenen mantar ekstrel TiO<sub>2</sub> NP, UV-Vis Spektrometre (UV-vis) ve taramalı elektron mikroskop (SEM) ile karakterize edilmiştir. Hazırlanan ve karakterize edilen bu NP'lerin, disk difüzyon yöntemi kullanılarak *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* ve *Streptococcus mutans* test patojenleri üzerinde antimikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır. Mantar ekstrel TiO<sub>2</sub> NP'lerin patojenler üzerinde zayıf bir inhibisyon etkisine sahip oldukları (7.5-9.3 mm), maksimum inhibisyonu (9.3 mm) *S. mutans*'a karşı gösterdiği buna karşın *C. albicans*'a karşı antifungal etkiye sahip olmadıkları tespit edilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Antimikrobiyal aktivite, *Pisolithus arrhizus*, TiO<sub>2</sub> nanopartikülü

**Antimicrobial Effect of Titanium Nanoparticles Synthesized Using *Pisolithus arrhizus* Extraction**

**Summary:** *Pisolithus arrhizus* (Scop.) Rauschert (Basidiomycetes) type is an ectomycorrhizal fungi found in the soil that surrounds many species of eucalyptus and pine trees. In this study, it was aimed to determine the inhibitory effect of Titanium (TiO<sub>2</sub>) nanoparticle (NP) prepared by using *Pisolithus arrhizus* ethanol extract on different pathogenic microorganisms. In the study, NP's synthesized using hydrothermal method was characterized by UV-vis spectrometer (UV-vis) and scanning electron microscope (SEM). The antimicrobial activity of these prepared and characterized NP's, have been investigated by using disk diffusion method on test pathogens of *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*. While NPs have a weak inhibitory effect on pathogens (7.5-9.3 mm), the maximum inhibition (9.3 mm) is shown against *S. mutans*. Whereas antifungal effect against *C. albicans* have not been found.

**Key words:** Antimicrobial activity, *Pisolithus arrhizus*, TiO<sub>2</sub> nanoparticle

**Giriş**

Nanoteknoloji, nanometre düzeyinde yeni malzemeler üretmek amacıyla bilim ve teknolojiye uygulamayla birlikte hızla büyüyen bir alan olarak ortaya çıkmaktadır (1). Nanomalzemeler, çeşitli fiziko-kimyasal özellikleri nedeniyle yüzlerce yeni ürünün geliştirilmesine neden olan ticari bir devrimin parçasıdır (27). Metal nanopartiküller yüksek bir spesifik yüzey alanı ve yüzey atomlarının yüksek oranına sahiptirler.

Kalay oksit, demir oksit, çinko oksit ve titanyum gibi metal oksit nanopartikülleri çok caziptir ve çeşitli ci-

haz uygulamalarında önemli bir yere sahiptir (23,24). TiO<sub>2</sub>, foto katalizi, güneş pili cihazları, gaz sensörleri ve biyomalzemeler gibi birçok alanda büyük önem taşıyan bir materyaldir (12). Titanya'nın toksik olmayan ve biyolojik olarak uyumlu özelliklerinden dolayı farmasötik endüstrilerde olduğu kadar kemik dokusu mühendisliği gibi biyomedikal bilimlerde de uygulamaları bulunmaktadır (11,15).

Katalitik aktivite, optik özellikler, elektronik özellikler, antibakteriyel özellikler ve manyetik özellikler gibi eşsiz fiziko-kimyasal karakteristikleri nedeniyle, nanopartikülleri geliştirmek için yapılan yeni sentez yöntem çalışmaları oldukça yoğunluk kazanmıştır (5,8,18,33). Nanopartikül sentezinde çevresel olarak toksik olmayan sentetik protokollere duyulan ihtiyaç, toksik kimyasalların kullanımından bağımsız biyolojik yaklaşımlara olan ilginin artmasına yol açmakta ve biyolojik sentez için deneysel süreçlerin geliştirilmesi, nanoteknolojinin önemli bir koluna dönüşmektedir (2,28). Bugüne kadar bakteriler de dahil olmak üzere

Geliş Tarihi/Submission Date : 26.09.2017

Kabul Tarihi/Accepted Date : 11.10.2018

\*Bu çalışma; "*Pisolithus arrhizus* Ekstraktı Kullanılarak Sentezlenen Titanyum Nanopartiküllerinin Antimikrobiyal Etkisi" adlı Bitirme tezinden özetlenmiştir. Ayrıca bu çalışmanın özeti, 26-29 Nisan 2017 tarihinde İstanbul'da düzenlenen 3. Uluslararası İlaç ve Eczacılık Kongresi'nde (IVEK) sunuldu ve özet metni sayfa 342'de yayımlandı.

mikroorganizmalar, mantar ve bitkiler kullanılarak biyolojik yaklaşımla yapılan bir çok nanopartikül sentezi bildirilmiştir (30).

Çalışmada kullanılan *P. arrhizus* Agaricomycete ailesine ait olup dünya çapında bir dağılıma sahip mikorizal bir mantar türüdür (22). Ülkemizde Antalya, Aydın, Balıkesir, Çanakkale, Denizli, İzmir, Kahramanmaraş, Kütahya, Malatya, Manisa, Mersin Muğla bölgeleri olmak üzere geniş bir yayılım alanına sahiptir (21). Yapılan birçok çalışmada mantarların antibakteriyel, antiviral ve antifungal etkileri bildirilmiştir (4,31)

Bu çalışmada, *P. arrhizus* etanol ekstraktlı TiO<sub>2</sub> NP'lerin sentezi ve karakterizasyonu, ayrıca NP'lerin patojen test mikroorganizmalar üzerindeki inhibisyon etkisi araştırılarak yeni bir antimikrobiyal strateji olasılığının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntem

### Kullanılan mikroorganizmalar

Çalışmada, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC 25923, *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC 35218, *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) ATCC 6633, *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) ATCC 68175 ve *Candida albicans* (*C. albicans*) ATCC 90028 standart suşları kullanılmıştır. Bu suşlar Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Biyoteknoloji ve Farmasötik Mikrobiyoloji kültür koleksiyonlarından temin edilmiştir.

### Araştırmada kullanılan makrofungus örneği

Bu araştırmada kullanılan *P. arrhizus* makrofungus örneği Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Doç. Dr. Hakan ALLI tarafından Muğla-Datça, İçmeler Deresi Bölgesinden toplanmış ve tanımlanmıştır.

### *P. arrhizus* ekstraktlarının hazırlanması

Mantar örnekleri kurutulmuş ve toz haline getirilmiştir. Her bir numunenin %70'lik etanol ekstraktı 3 gün manyetik bir karıştırıcıda 37°C'de karıştırılarak hazırlanmıştır. Ekstraktlar vakum altında bir desikatörde kurutulmuş ve liofilize edilmiştir.

### TiO<sub>2</sub> NP'nin sentezi ve karakterizasyonu

Mantar ekstresi (1mL) (10%w/v) çözeltisi, 50 mM Ti (IV) (5mL) isopropoxide çözeltisine eklenerek homojen bir çözelti elde edilinceye kadar oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Daha sonra elde edilen karışım, teflon kaplı paslanmaz çelik otoklav içerisine aktarılmış ve fırın sıcaklığı 80 °C ye ayarlanarak belirli bir süre inkübe edilmiştir. Teflon kap dibinde oluşan ürün TiO<sub>2</sub> NP, su ve etanol ile sonikasyon altında en az 3 kez yıkanarak bağlanmamış mantar ekstresi fazlası ortamdaki uzaklaştırılarak TiO<sub>2</sub> NP çökeleği elde edilmiş ve vakum altında 60°C derecede kurutulmuştur.

Çökelti tampon içerisinde çözülerek stok çözelti ppm olarak ayarlanmıştır. Daha sonra elde edilen TiO<sub>2</sub> NP karakterizasyon ve antimikrobiyal çalışmalar için saklanmıştır. TiO<sub>2</sub> NP'nin morfolojisi ve boyutu taramalı elektron mikroskopu (SEM, ZEISS EVO LS10, 25 kV), absorbanans noktası ise Uv-Vis spektrometresi (Perkin Elmer) ile karakterize edilmiştir.

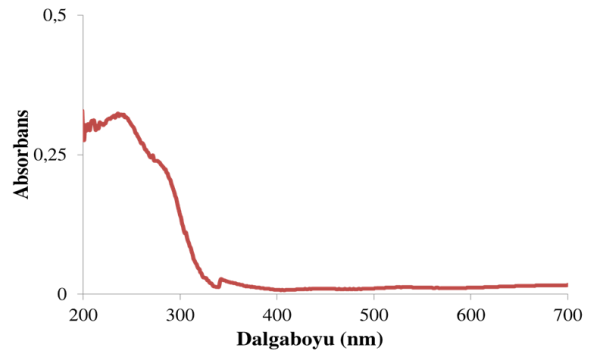
### Antimikrobiyal aktivite testi

Çalışmada kullanılan *P. arrhizus* ekstraktı ile hazırlanan NP'nin test mikroorganizmaları üzerindeki inhibisyon etkisini belirlemek amacıyla disk diffüzyon yöntemi kullanılmıştır (7). Disk diffüzyon testinde, bakterilerin gelişimi için nutrient sıvı (NB), *C. albicans* için ise sabouraud dextrose sıvı (SDB) (Merck) kullanılmıştır. Test bakterileri NB, *C. albicans* ise SDB besiyerlerinde 37°C'de 24 saat inkübe edilerek aktifleştirilmiştir. Antimikrobiyal duyarlılık testi, çalışmada kullanılan bakteriler için nutrient agarda, *C. albicans* için ise sabouraud dekstroz agarda gerçekleştirildi. Elde edilen kültürler Mc Farland 0.5 nolu bulanıklık standartına göre ayarlandıktan sonra her birinden 100 µL alınarak ayrı ayrı besiyerlerine cam bir baget yardımıyla yayılmıştır. Daha sonra 6 mm çapındaki steril diskler (Bioanalyse, Antimicrobial Susceptibility Test Discs) besiyerlerinin yüzeyine belli aralıklarla yerleştirilmiştir. Yerleştirilen disklerin üzerine 20 µL *P. arrhizus* ekstresi ile hazırlanan NP, mikro pipetlerle ilave edilerek emdirilmiştir. Petri kapları 37 °C'de 24 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. Inkübasyon sonunda disk çevresinde oluşan zonların çapı kumpas ile ölçülmüştür.

## Bulgular

### UV-vis spektrofotometre

TiO<sub>2</sub> NP'nin karakteristik ışık absorbanans noktası Şekil 1'de gösterilmektedir. TiO<sub>2</sub> NP~246 nm civarında zayıf ve geniş bir absorbanans piki vermiştir.

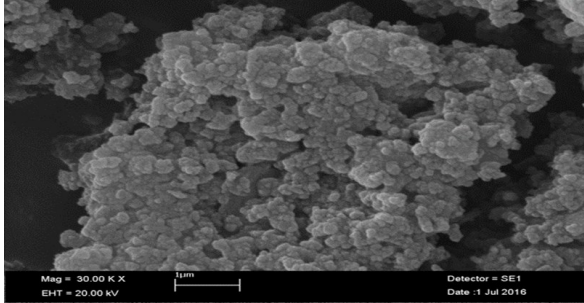


Şekil 1. TiO<sub>2</sub> UV-vis spektroskopisi (TiO<sub>2</sub>'nin karakteristik absorbanans pik: ~246 nm=0,354)

### Taramalı elektron mikroskopu (SEM)

TiO<sub>2</sub> NP'nin taramalı elektron mikroskopu (SEM) görüntüleri Şekil 2'de gösterilmiştir. Buna göre, TiO<sub>2</sub>

NP'nin boyutu  $65\pm 5$  nm civarında ölçülmüştür. Morfolojileri ise genel itibarı ile küresel olarak gözlenmiştir.



Şekil 2. TiO<sub>2</sub>NP'lerin SEM görüntüsü  $65\pm 5$  nm

### Antimikrobiyal aktivite

Disk difüzyon metoduna göre tespit edilen antimikrobiyal aktivite sonuçları Tablo 1'de verilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre; sentezlenen mantar ekstreli titanyum nanopartikülünün hem Gram negatif hem de Gram bakterilere karşı inhibitörük etkiye sahip olduğu fakat *C. albicans* ATCC 90028 suşuna karşı antifungal aktiviteye sahip olmadığı tespit edilmiştir. Test edilen patojen bakteriler arasında *P. arrhizus* - TiO<sub>2</sub>NP'lün en yüksek aktiviteyi *S. mutans* ATCC 68175 suşuna karşı göstermiş olduğu belirlenmiştir.

Tablo 1. *P. arrhizus* -TiO<sub>2</sub>NP'lünün antimikrobiyal aktivite sonuçları

Test suşları	İnhibisyon Zon Çapı (mm)	
	<i>P. arrhizus</i> -TiO <sub>2</sub> NP	
<i>E. coli</i>	8.0±0.0	
<i>S. aureus</i>	8.2±0.0	
<i>S. mutans</i>	9.3±0.0	
<i>B. subtilis</i>	7.5±0.0	
<i>C. albicans</i>	-	

"-" Herhangi bir etki gözlenmemiştir; "±" Ortalama ±Standart sapma

### Tartışma ve Sonuç

Nanopartiküller, nano ölçekli boyutlarından dolayı benzersiz katalitik, optik, manyetik ve elektriksel özelliklere sahiptirler (32). Gümüş ve altınların biyosentezi üzerine birçok araştırma uzun yıllardır yapılmaktadır. Hem altın hem de gümüş nanopartiküllerin çeşitli alanlarda yoğun uygulamaları bulunmaktadır (29). Lantum ve titanyum gibi nadir metal nanopartiküllerinin biyosentezi konusunda ise pek fazla çalışma rapor edilmemiştir. Titanyum nanopartikülleri oksijen ve hidroksil serbest radikallerini elde etmek için yüzeye adsorbe edilen O<sub>2</sub> ve OH<sup>-</sup> ile reaksiyona girme kabiliyetine sahip, kozmetik ürünler ve farmasötik de dahil bir çok alanda büyük önem taşıyan bir malzemedir (17,26).

Yakın zamanlarda nanopartikül sentezleri bakteri (16,25), mantar (2,9) ve bitkiler (3,6,14,19) ile elde edilmiştir. Ancak literatür araştırmalarında *P. arrhizus*

mantarı ile yapılan çalışmalara rastlanmamıştır. Çalışmada sentezlenen mantar ekstreli TiO<sub>2</sub> nanopartikülü, disk difüzyon yöntemi ile *E. coli*, *S. aureus*, *S. mutans*, *B. subtilis* ve *C. albicans* standart suşlarına karşı antimikrobiyal etkinlikleri bakımından test edildi. Maksimum inhibisyon zonu (9.3 mm) *S. mutans*'a karşı belirlendi. Petrilerde ölçülen inhibisyon zonları TiO<sub>2</sub> nanopartikülünün bakteri türlerine karşı zayıf inhibitörük etkiye sahip olduğunu ayrıca *C. albicans*'a karşı antifungal aktivite göstermediklerini ortaya koymuştur. TiO<sub>2</sub> parçacıklarının bakterisidal etkisini açıklayan birkaç muhtemel mekanizma vardır. TiO<sub>2</sub>, güneş ışığına veya UV ışığına maruz bırakıldığında güçlü oksitleyici özelliği nedeniyle antimikrobiyal aktivite gösterir. Mikrobiyal yüzey, ışınlanmış TiO<sub>2</sub> parçacıkları ile temas ettiğinde başlangıçtaki oksidatif atağın ana hedefi olur (10,20) Ayrıca TiO<sub>2</sub> parçacıkları üzerinde oluşturulan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarının çeşitli bakteri türlerine karşı antibakteriyel aktivite gücünü etkilediği rapor edilmiştir (13,20).

Nanoteknolojiye teknolojik faydaları açısından baktığımızda, laboratuvarından büyük ölçekli endüstriyel üretime hızla geçmeye başladıkça, artık tüm biyomedikal uygulamalarda nanomalzemelerin oldukça gözde olduğu görülmektedir. Günümüzde TiO<sub>2</sub> NP'ler, optik özellikleri, yüksek kimyasal stabilite ve toksik olmamaları nedenleriyle çevreye uyumlu ve temiz bir fotokatalist olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Özellikle TiO<sub>2</sub> NP'ler, cilt bakım ürünlerinde cildi UV ışınlarından korumada kullanılan en önemli materyallerinden biridir. Sonuç olarak bu çalışma, *P. arrhizus*-TiO<sub>2</sub> NP'lerin çalışmada kullanılan test mikroorganizmaları üzerinde etkinliğinin yüksek olmadığını ancak antimikrobiyal aktivite testlerinin farklı konsantrasyonlarda ve yaygın diğer patojen mikroorganizma türlerinde daha detaylı bir şekilde uygulanması gerektiğini önermektedir.

### Kaynaklar

1. Abdelrahim SI, Almagboul AZ, Omer ME, Elegami A. Antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. Fitoterapia 2002; 73(7-8): 713-5.
2. Ahmad A, Mukherjee P, Senapati P, Mandal D, Islam Khan M, Kumar R, Sastry M. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*. Colloid Surf B 2003; 28

- (4): 313-8.
3. Arangasamy L, Munusamy V. Tapping the unexploited plant resources for the synthesis of silver nanoparticles. *Afr J Biotechnol* 2008; 7(17):3162-5.
  4. Boh B, Berovic M, Zhang J, Zhi-Bin L. *Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically Active compounds. *Biotechnol Annu Rev* 2007; 13: 265-301.
  5. Catauro M, Raucci MG, De Gaetano FD, Marotta A. Sol-gel processing of drug delivery materials and release kinetics. *J Mater Sci Mater Med* 2005; 16(3):26 1-5.
  6. Chandran SP, Chaudhary M, Pasricha R, Ahmad A, Sastry M. Synthesis of gold nanotriangles and silver nanoparticles using *Aloe vera* plant extract. *Biotechnol Prog* 2000; 22: 577-83.
  7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard. Tenth Edition. M02-A10, PA/USA: Wayne, 2009.
  8. Crabtree JH, Brruchette RJ, Siddiqi Ra, Huen IT, Handott LL, Fishman A. The efficacy of silver-ion implanted catheters in reducing peritoneal dialysis-related infections. *Perit Dial Int* 2003; 23(4): 368-74.
  9. Duran N, Marcato PD, Alves OL, De Souza GIH, Esposito E. Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. *J Nanobiotechnol* 2005; 3: 8-14.
  10. Foster AH, Sheel WD, Sheel P, Evans P, Varghese S, Rutschke N, et al. Antimicrobial activity of titania/silver and titania/copper films prepared by CVD. *J Photochem Photobiol A* 2010; 216: 283-9.
  11. Gerhardt L-C, Jell GMR, Boccaccini AR. Titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles filled polyD, L-lactid acid (PDLLA) matrix composites for bone tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med* 2007; 18(7): 1287-98.
  12. Gong XQ, Selloni A. Reactivity of anatase TiO<sub>2</sub> nanoparticles: The role of the minority (001) surface. *J Phys Chem* 2005; 109(42): 19560-2.
  13. Howard A, Foster IB, Ditta S, Varghese AS. Photocatalytic disinfection using titanium dioxide: spectrum and mechanism of antimicrobial activity. *App Microbiol Biotechnol* 2011; 90: 1847-68.
  14. Huang J, Li Q, Sun D, Lu Y, Su Y, Yang X, Wang H, Wang Y, Shao W, He N, Hong J, Chen C. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried *Cinnamomum camphora* leaf. *Nanotechnology* 2007; 18: 105104-14.
  15. Jha AK, Prasad K, Kulkarni AR. Synthesis of TiO<sub>2</sub> nanoparticles using microorganisms. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2009; 71(1): 226-9.
  16. Joerger R, Klaus T, Granqvist CG. Biologically produced silver-carbon composite materials for optically functional thin-film coating. *Adv Mater* 2001; 12: 407-9.
  17. Kirthi AV, Rahuman AA, Rajakumar G, Marimuthu S, Santhoshkumar T, Jayaseelan C, Elango C, Abduz Zahir A, Kamaraj C, Bagavan A. Biosynthesis of titanium dioxide nanoparticles using bacterium *Bacillus subtilis*. *Mater Lett* 2011;65 (17): 2745-7.
  18. Krolkowska A, Kudelski A, Michota A, Bukowska J. SERS studies on the structure of thioglycolic acid monolayers on silver and gold. *Surf Sci* 2003; 532-535: 227-32.
  19. Li S, Shen Y, Xie A, Yu X, Qiu L, Zhang L, Zhang O. Green synthesis of silver nanoparticles using *Capsicum annuum* L.extract. *Green Chem* 2007; 9: 852-58.
  20. Maness PC, Smolinski S, Blake DM, Huang Z, Wolfrum EJ, Jacoby WA. Bactericidal activity of photocatalytic TiO<sub>2</sub> reaction: Toward an understanding of its killing mechanism. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 4094-8.
  21. Manzi P, Gambelli L, Marconi S, Vivanti V, Pizzoferrato L. Nutrients in edible mushroom: an inter-species comparative study. *Food Chem*, 1999; 65: 477-82.
  22. Marx DH. Tree host range and world distribution of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. *Can J Microbiol* 1977; 23: 217-33.
  23. Maurya A, Chauhan P, Mishra A, Pandey AK. Surface functionalization of TiO<sub>2</sub> with plant extracts and their combined antimicrobial activities against *E. faecalis* and *E. coli*. *J Res Updates Polym Sci* 2012; 1(1): 43-51.
  24. Mboniyirivuze A, Omollo I, Ngom BD, Mwakikunga B, Dhlamini SM, Park E, Maaaza M. Natural dye sensitizer for Grätzel cells: *Sepia melanin*. *PMC* 2015; 3(1): 1-6.
  25. Nair B, Pradeep T. Coalescence of nanoclusters and the formation of sub-micron crystallites assisted by *Lactobacillus* strains. *Cryst Growth Des* 2002; 2: 293-8.
  26. Rajakumar G, Rahuman AA, Priyamvada B, Khanna VG, Kumar DK, Sujin PJ. *Eclipta prostrata* leaf aqueous extract mediated synthesis of titanium dioxide nanoparticles. *Mater Lett* 2012; 68: 115-7.

27. Salata O. Application of nanoparticles in biology and medicine. J Nanobiotechnol 2004; 2(3): 3-6.
28. Shankar SS, Rai A, Ahmad A, Sastry MJ. Rapid synthesis of Au, Ag and bimetallic Au core-Ag shell nanoparticles using Neem (*Azadirachta indica*) leaf broth. J Colloid Interf Sci 2004; 275(2): 496-502.
29. Singh N, Chatterjee A, Chakraborty K, Chatterjee S, Abraham J. Cytotoxic effect on MG-63 cell line and antimicrobial and antioxidant properties of silver nanoparticles synthesized with seed extracts of *Capsicum sp.* Rec Nat Prod; 2016: 10 (1): 47-57.
30. Singhal G, Bhavesh R, Kasariya K, Sharma AR, Singh RP. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Ocimum sanctum* (Tulsi) leaf extract and screening its antimicrobial activity. JNR 2011; 13 (7): 2981-8.
31. Solak MH, Kalmis E, Saglam H, Kalyoncu F. Antimicrobial activity of two wild mushrooms *Clitocybe alexandri* (Gill.) Konr. and *Rhizopogon roseolus* (Corda) T.M. fries collected from Turkey. Phytotherapy Research, 2006;20: 1085–87.
32. Thamima M. Karuppuchamy S. Biosynthesis of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles from natural sources: A review. ASEM 2014; 6: 1-8.
33. Zhao G, Stevens JS. Multiple parameters for the comprehensive evaluation of the susceptibility of *Escherichia coli* to the silver ion. Biometals 1998; 11(1): 27-32.

