

Universitatea de Științele Vieții “Regele Mihai I” din Timișoara



Facultatea de Agricultură

Ing. Osiceanu (Imbrea) Magdalena Cristina

TEZĂ DE DOCTORAT

-Rezumat-

*Cercetări privind biologia și tehnologia de cultivare
a speciei *Hyssopus officinalis* L*

Conducător Științific

Prof. Dr. Ing Georgeta POP

Timișoara

2023

Utilizarea plantelor medicinale în diferite scopuri a fost practică de secole de-a lungul întregii lumi. Printre acestea se numără și isopul (*Hyssopus officinalis* L.), care deși cunoscut din antichitate și menționat în scrierile biblice, datorită multiplelor beneficii pentru sănătate transmise din generație în generație ca și carminativ, tonic, antiseptic, expectorant și calmant pentru tuse, este prezent în atenția cercetătorilor din întreaga lume.

Motivul alegerii acestei teme pentru teza de doctorat s-a datorat valorii deosebite a acestei plante, dată în principal de multiplele utilizări și care, la ora actuală, este foarte puțin prezentă în stuctura culturilor de plante medicinale din țara noastră.

Pornind de la aceste premize, mi-am propus prin obiectivele stabilite, să contribui la completarea datelor din literatura de specialitate referitoare la tehnologia de cultivare în actualul context climatic. De asemenea, furnizarea de informații care să completeze cunoașterea în ceea ce privește utilizarea în scop medicinal al acestei plante, prin studierea activității antimicrobiene și antiinflamatorii a uleiului, în funcție de anul de cultură, cunoscut fiind faptul că isopul este o cultură perenă.

Studiile la teza de doctorat cu titlul „*Cercetări privind biologia și tehnologia de cultivare a speciei *Hyssopus officinalis* L*” au vizat:

CERCETĂRI ASUPRA MASEI A 1000 SEMINȚE (MMB) ȘI A GERMINAȚIEI LA ISOP (*HYSSOPUS OFFICINALIS*)

Obiectivul acestor cercetări, a urmărit analiza masei a 1000 de semințe (MMB) și a germinației, în funcție de anul de cultură, la trei varietăți de culoare (alb, albastru și roz). Masa a 1000 de semințe este un indicator care arată mărimea semințelor, oferă informații asupra calității acestora și a condițiilor de cultură, exprimând potențialul ca și material de înmulțire. Datorită faptului că semințele de isop sunt mici, iar înmulțirea se realizează atât prin semănat direct cât și prin răsad, germinația semintelor este un proces foarte important, influențat de calitatea acestora.

Studiul s-a efectuat asupra celor trei varietăți de culoare, și anume: isop cu flori roz, isop cu flori albastre și isop cu flori albe, existente în colecția disciplinei de Fitotehnie din cadrul Facultății de Agricultură din Timișoara, provenite din trei ani de cultură.

Determinarea masei a 1000 de seminte (MMB) s-a realizat prin numărarea în două repetiții a câte 500 semințe pure, luate la întâmplare, care s-au cântărit separat. Ca rezultat al determinării, s-a luat suma maselor celor doua repetiții. Testarea germinației s-a efectuat în vase Petri, la temperatura de 23° C.

Cercetările întreprinse asupra masei a 1000 de semințe și a germinației la trei varietăți de culoare de isop (roz, albastru și alb), prin constatările făcute, contribuie la îmbunătățirea informațiilor legate de tehnologia de înmulțire a acestei specii, care deși este cunoscută încă din scrierile biblice, în țara noastră și în Europa este puțin aprofundată.

Masa a 1000 de semințe este un caracter influențat de varietatea de culoare, iar în funcție de anul de cultură, isopul fiind o plantă perenă, cea mai mare valoare a masei a 1000 de semințe se obține în primul an de vegetație, urmând ca în următorii ani, valoarea masei a 1000 de semințe să se reducă. Pornind de la această constatare, recomandăm ca pentru producerea de răsad la isop, să se folosească semințe recoltate în primul an de vegetație.

Analizând contribuția factorilor experimentali la realizarea masei a 1000 de semințe, rezultatele arată că varietatea de culoare contribuie la realizarea MMB cu 69,8%, anul de cultură contribuie cu 13,9%, iar interacțiunea celor doi factori cu 5,7%. Deci cea mai mare contribuție o are factorul varietate de culoare, urmat de factorul an de cultură și interacțiunea acestora.

Cu referire la procentul de germinare, cele mai mari valori s-au obținut în anul 1 la isopul albastru (98,07%), urmat de isopul roz (96,03%). Tot valori de peste 90% de germinare s-au obținut și în anul 2 de cultură, la aceleași varietăți de culoare (95,93%, la albastru și 93,99%, la roz). De remarcat faptul că, la isopul alb, unde s-a obținut cea mai mare masă a 1000 de semințe, procentul de germinare s-a înscris cu valori cuprinse între 70,05% în anul 3 de cultură și 80,01%, în primul an de cultură, valori mult sub media experienței (86,34%).

Factorul A (varietatea de culoare), contribuie la realizarea germinației în proporție de 70,23% în timp ce factorul B (anul de cultură), contribuie cu 27,7%, iar interacțiunea celor doi factori cu 2,043%.

CERCETĂRI ASUPRA ÎNĂLȚIMII ȘI GREUTĂȚII PLANTELOR, A PRODUCȚIEI DE MASĂ VERDE ȘI USCATĂ ȘI A CONȚINUTULUI DE SUBSTANȚĂ USCATĂ LA ISOP (*HYSSOPUS OFFICINALIS*)

Isopul fiind o plantă de la care se recoltează herba, obiectivul cercetărilor prezentate în acest capitol, a vizat modul cum elemente care contribuie la producția de herba (înălțimea plantelor, greutatea acestora, producția de masă verde, producția de frunze uscate și conținutul de substanță uscată), sunt influențate de condițiile de cultură, varietatea de culoare de isop și anul de vegetație.

Cercetările s-au efectuat asupra celor trei varietăți de culoare, și anume: isop cu flori roz, isop cu flori albastre și isop cu flori albe, existente în colecția disciplinei de Fitotehnie din cadrul Facultății de Agricultură din cadrul Universității de Științe Vieții „Regele Mihai I” din Timișoara, provenite din trei ani de cultură. Observațiile s-au efectuat conform metodologiei specifice pentru astfel de experiențe, respectiv prin măsurarea taliei, recoltarea herbei și cântărirea acesteia în starea proaspătă, s-au după uscare. Observațiile s-au efectuat în fenofaza de înflorire a plantelor de isop, recomandată de literatura de specialitate.

Experiența a fost efectuată în cadrul SCDA Lovrin, câmpul de plante medicinale, amplasat pe un sol de tip cernoziom cambic, slab gleizat.

Experiența a fost de tip cultură comparativă cu trei varietăți de culoare de isop (roz, albastru și alb), cu scopul de a urmări cantitatea de herba ce se poate obține în funcție de anul de cultură, isopul fiind cultivat ca și plantă perenă.

Pentru prelucrarea și interpretarea rezultatelor experimentale s-au utilizat programele: pentru analiza varianței – statistica (ANOVA), MSTATC, pentru corelații și regresii – statistica – Regresii și Grafice și procedurile cu formule privind aportul factorilor și DL-uri - în EXCEL, analiza Cluster, iar pentru analiza componentelor principale s-a utilizat programul STATISTICA.

Rezultatele obținute reliefează că:

Înălțimea plantei în funcție de varietatea de culoare, scade în valoare de la varianta 1 (isop roz) la varianta 2 (isop albastru), după care crește. Deci avem un trend descendent, de la v1 la v2, și un trend ascendent de la v2 la v3. Valorile înălțimii plantei obținute la cele trei variante, au fost 58,31 cm la v1, 56,64 cm la varianta 2 și 66 cm la varianta 3, deci cea mai mare valoare a fost obținută la varianta 3 (isop alb).

Înălțimea plantei în funcție de anul de cultură, crește de la anul 1 la anul 3, avem astfel un trend ascendent în funcție de anul de producție. Valorile înălțimii plantei, au variat între 58,6 cm (an 1) și 62,3 cm (an 3). Diferențele dintre ani sunt foarte semnificative ($p < 0.001$).

În cei trei de ani de cultură, înălțimea plantei are un trend ascendent, indiferent de variantă. Cea mai mare valoare a înălțimii plantei, se obține la v3 (isopul alb), iar cea mai mică la v2 (isopul albastru).

Comparând anii între ei, se deduce faptul că, cea mai mare valoare pentru înălțimea plantei, s-a obținut în anul 3 de cultură, iar cea mai mică în anul 1 de cultură.

Referitor la aportul factorilor la realizarea înălțimii plantei, se poate afirma faptul că:

- factorul A (varietatea de culoare), are o acțiune foarte semnificativă, adică între cele trei variante urmărite în experiență, există diferențe foarte semnificative în ceea ce privește înălțimea;
- Factorul B (anul de cultură), are o acțiune foarte semnificativă, deci diferența între anii de cultură, isopul fiind o plantă perenă, este foarte semnificativă;
- Interacțiunea AxB, prezintă o acțiune foarte semnificativă. Înălțimea plantei la cele trei variante a reacționat diferit în cei trei ani experimentali.

Greutatea plantei scade în valoare de la varianta 1 (isop roz), la varianta 2 (isop albastru), după care crește. Avem astfel un trend descendent, de la v1 la v2 și un trend ascendent de la v2 la v3. Valorile greutateii plantei obținute la cele trei variante au fost: 477,34 g la v1, 408,7 g la varianta 2 și 491 g la varianta 3. Greutatea plantei cu valoarea cea mai mare, s-a obținut la varianta 3 (isop alb).

În funcție de anul de cultură, greutatea plantei crește de la anul 1 la anul 3, deci avem un trend ascendent în funcție de anul de producție. Valorile greutateii plantei au variat între 390 g (an 1) și 540 g (an 3). Diferențele dintre ani sunt asigurate statistic ca foarte semnificative ($p < 0.001$). Valoarea cea mai mare s-a obținut în anul 3 de producție de 540 g.

Referitor la aportul factorilor la realizarea greutateii plantei, se poate afirma faptul că, varietatea de culoare are o acțiune foarte semnificativă, de asemenea și anul de cultură, diferența între anii de cultură este asigurată statistic ca foarte semnificativă. Așadar, greutatea plantei la cele trei variante a înregistrat valori diferite în cei trei ani experimentali.

Producția de masă verde/plantă scade în valoare de la isopul roz la isopul albastru, după care crește. Deci avem un trend descendent de la v1 (isopul roz), la v2 (isopul albastru) și un trend ascendent de la v2 (isopul albastru) la v3 (isopul alb). Valorile producției de masă verde/plantă obținute la cele trei varietăți de culoare au fost următoarele: 1,7 kg la v1 (isopul roz), 1,52 kg la v2 (isopul albastru) și 1,8 kg la v3 (isopul alb). Cea mai mare cantitate de masă verde/plantă se obține la isopul alb.

Analizând anul de cultură, producția de masă verde crește de la anul 1 la anul 3, deci avem un trend ascendent în funcție de anul de producție. Valorile producției de masă verde/planta, au variat între 1,2 g (an 1) și 2,2 g (an 3). Diferențele dintre ani sunt asigurate statistic ca foarte semnificative ($p < 0.001$)

În cei trei ani experimentali, producția de masă verde/planta, are un trend ascendent, indiferent de varietatea de culoare. Cea mai mare valoare a producției de masă verde/planta, se obține la v3 (isopul alb), iar cea mai mică la v2 (isopul albastru). De remarcat faptul că, la isopul roz și alb, producția de masă verde/plantă are valori apropiate.

Comparând anii de cultură între ei, se deduce faptul că, cea mai mare cantitate de masă verde/plantă s-a obținut în anul 3 de producție, iar cea mai mică în anul 1 de cultură.

Producția de frunze uscate, scade în valoare, de la varianta 1 la varianta 2, după care crește. Deci avem un trend descendent de la v1 la v2, precum și un trend ascendent de la v2 la v3. Valorile producției de frunze uscate, obținute la cele trei variante, au fost 0,25 kg la v1, 0,20 kg la varianta 2 și 0,24 kg la varianta 3. De remarcat faptul că, cea mai mare valoare a producției de frunze uscate se obține la varianta 1, urmată de varianta 3, la cele două variante se obțin valori apropiate.

Producția de frunze uscate crește de la anul 1 la anul 3, avem astfel un trend ascendent în funcție de anul de producție. Valorile producției de frunze, au variat între 0,18 kg (anul 1) și 0,30 kg (anul 3). Diferențele dintre ani sunt foarte semnificative ($p < 0.001$).

În cei trei ani de producție, producția de frunze uscate are un trend ascendent, indiferent de variantă. Cea mai mare valoare a producției de frunze uscate, se obține la v1 (varianta 1), iar cea mai mică la v2 (varianta 2). În anul 2 și anul 3 de producție, valorile producției de frunze uscate obținute la v1 și v3 sunt apropiate.

Comparând anii între ei, observăm faptul că, cea mai mare valoare pentru producția de frunze uscate, s-a obținut în anul 3 de producție, iar cea mai mică în primul an de producție.

- factorul A (varianta), are o acțiune foarte semnificativă, adică între cele trei variante urmărite în experiență, există diferențe foarte semnificative în ceea ce privește producția de frunze uscate;
- Factorul B (anul), are o acțiune foarte semnificativă, deci diferența între anii de producție este foarte semnificativă;
- Interacțiunea AxB, prezintă o acțiune foarte semnificativă. Deci producția de frunze la cele trei variante, a reacționat diferit în cei trei ani experimentali.

Conținutul de substanță uscată (SU) scade în valoare de la isopul cu flori roz la isopul cu flori albastre, după care crește. Valorile conținutului de substanță uscată obținute la cele trei varietăți de isop au fost 23.7 % la **isopul roz**, 23.3 % la isopul albastru și 23.4 % la isopul alb, deci cea mai mare valoare obținându-se la isopul roz.

În funcție de anul de cultură valorile conținutului de substanță uscată au variat între 22.4 % [anul 1] și 24.6 % [anul 3]. Diferențe dintre ani sunt foarte semnificative [$p < 0.001$]

CERCETĂRI PRIVIND COMPOZIȚIA CHIMICĂ A ULEIULUI ESENȚIAL DE ISOP (HYSSOPUS OFFICINALIS)

Cercetările au urmărit extragerea uleiului esențial de isop din probele supuse analizelor multiparametrice, precum și stabilirea compușilor biologic activi, prin metode specifice.

S-a urmărit ca și obiective: recoltarea materialului biologic în momentul optim, extracția uleiului esențial, determinarea compoziției chimice.

Plantele au fost recoltate în perioada optimă de vegetație, respectiv când peste 50% din inflorescențe erau înflorite. S-au recoltat probe pentru fiecare din cele trei forme cultivate: roz – *H. officinalis* f. *ruber*, alb - *H. officinalis* f. *albus* și albastru - *H. officinalis* f. *cyaneus*. S-au prelevat probe din două locații diferite: Stațiunea Didactică Timișoara (SDT) și Stațiunea de Cercetare și Dezvoltare Agricolă Lovrin.

Extracția uleiurilor esențiale s-a realizat din masa uscată a plantelor (herba), respectiv porțiunile de tulpină ce includ inflorescențele și frunzele, fără partea bazală lignificată.

Extracția uleiului esențial a fost efectuată pentru părțile aeriene uscate ale plantelor, folosind echipamente de hidrodistilare (extractor Clevenger, model experimental, Timișoara, România). Uleiurile esențiale rezultate și amestecul de apă aromatică au fost separate utilizând o pâlnie de separare. Uleiurile esențiale pure au fost depozitate în flacoane de sticlă la +4°C până la o analiză ulterioară.

Caracterizarea chimică s-a făcut folosind un echipament cromatograf în fază gazoasă Shimadzu QP 2010Plus, Columbia, SC, SUA cu spectrometru de masă (GC/MS) și coloana capilară AT WAX (caracteristici 30 m × 0,32 mm × 1 μm).

Heliu a fost folosit ca gaz purtător cu un debit de 1ml/min cu o presiune a coloanei de 42 kPa. Separarea componentelor a fost realizată în conformitate cu următorul program: 40 °C timp de 1 minut o rată de 5 °C/min la 210°C timp de 5 min. Temperatura injectorului și a sursei de ioni au fost de 250 °C și, respectiv, 220 °C. Volumul de injecție a fost de 1 μL de soluție de hexan de ulei esențial cu un raport de splitare de 1:50. Baza de date NIST 5 Wiley 275 a fost utilizată pentru identificarea compușilor volatili prin calcularea indicelui de retenție liniară (LRI)

Rezultatele analizelor privind compoziția chimică a uleiurilor, pe cei doi ani experimentali analizați, prezintă valori apropiate. Cei trei compuși majoritari identificați, au fost în toate cazurile, pinocamfona, izopinocamfona și beta-pinenul.

Pentru anul experimental 2021, pinocamfona a constituit compusul majoritar doar în cazul uleiului roz provenit din lotul experimental din Timișoara, atingând o valoare de 45,966%. Isopul alb din aceeași locație, a avut valori apropiate pentru primii doi compuși majoritari (pinocamfona 31,914% și izopinocamfona 32,001%). În celelalte patru cazuri analizate, izopinocamfona a avut valori procentuale mai ridicate decât pinocamfona, dominând clar în cazul uleiului albastru de la Lovrin (izopinocamfona 54,750% și pinocamfona 6,093%).

Beta-pinenul a avut valori cuprinse între 9,447% (isop roz Timișoara) și 15,846% (isop albastru Lovrin). Toate uleiurile provenite din câmpul experimental Lovrin, indiferent de genotip, au prezentat procentul de izopinocamfonă mai ridicat decât cel de pinocamfonă.

Alți compuși chimici identificați în procent mai mare de 1%, pentru toate genotipurile studiate în anul experimental 2021, au fost: sabinene, beta-mircen, beta-felandren, ciclohexen, cariofilen, gamma-elemen, mirtenol, germacren D.

Pentru anul experimental 2022, pinocamfona a constituit compusul majoritar, în cazul uleiurilor provenite din isopul roz, recoltat din ambele locații, respectiv 46,741% Timișoara și 41,764% Lovrin. Izopinocamfona, compusul majoritar complementar, prezintă în acest caz valori de 20,333% pentru uleiul recoltat din Timișoara și 18,029% pentru cel provenit din Lovrin.

La uleiul provenit din isopul albastru, observăm ca și în anul 2021, ca și compus dominant, izopinocamfona cu 41,769% pentru zona Lovrin și 30,073% pentru zona Timișoara.

Uleiul provenit din isopul alb atât de la Timișoara cât și de la Lovrin, a avut valori apropiate cu cele determinate în anul experimental precedent, atât în ceea ce privește procentul compușilor majoritari, cât și în privința compusului principal majoritar.

Al treilea compus principal terpenic, beta-pinenul, a atins valori asemănătoare pentru cinci din cele șase probe de ulei, cu procente cuprinse între 13,252% și 14,085%. Isopul roz de la Timișoara a avut un procent de sub 10%, deoarece primii doi compuși majoritari însumați, au atins cel mai ridicat procent, dintre toate probele analizate, de peste 67%.

Alte chemotipuri terpenice minoritare, identificate în procent mai mare de 1% pentru toate genotipurile studiate, au fost: biciclohexan, beta-mircen, beta-felandren, ciclohexen, cariofilen, aloaromadendren, gamma-elemen, germacren D.

CERCETĂRI PRIVIND PROPRIETĂȚILE ANTIMICROBIENE ALE ULEIULUI ESENȚIAL DE ISOP (*HYSSOPUS OFFICINALIS*)

Cercetările au urmărit analiza activității antimicrobiene a uleiurilor esențiale obținute din diferite varietățile de isop, provenit din două locații distincte, în doi ani experimentali diferiți, 2021 și 2022. Activitatea biologică a fost evaluată folosind metoda microdiluției.

S-a urmărit ca și obiective: testarea uleiurilor esențiale; determinarea activității biologice a acestora prin metoda microdiluției; stabilirea corelațiilor între parametrii supuși analizelor.

Extragerea uleiurilor analizate s-a efectuat din părțile aeriene uscate ale plantei de isop, așa cum s-a prezentat în capitoul anterior. Caracteristici diferite au fost obținute din cele trei varietăți de isop din anul II (2021) și III de cultură (2022), recoltate din două zone diferite Stațiunea Didactică Timișoara (SDT) și Stațiunea de Cercetare și Dezvoltare Agricolă Lovrin.

Metoda de microdiluție în bulion

Tulpinile microbiene de referință (ATCC) utilizate în acest studiu au fost obținute din colecția de cultură a Laboratorului de Microbiologie al Platformei de Cercetare Interdisciplinară din cadrul Universității de Științe Vieții "Regele Mihai I" din Timișoara, aici desfășurându-se aceasta etapă de cercetare.

Probele de ulei esențial au fost testate pe următoarele tulpini de referință: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Shigella flexneri* (ATCC 12022), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Haemophilus influenzae tip B* (ATCC 10211), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) și *Candida albicans* (ATCC 10231).

MIC este definit ca cea mai mică concentrație testată care nu produce nici o creștere vizibilă, detectabilă a microorganismelor. Cercetări anterioare au descris metoda ca și pierderea de masă microbială prin măsurarea OD prin spectrofotometrie în conformitate cu ISO 20776-1:2019

Toate uleiurile testate în cei doi ani experimentali 2021 și 2022, prezintă activitate antimicrobiană împotriva tulpinii de *Staphylococcus aureus*, încă de la concentrația minimă testată, respectiv 1%. Toți coeficienții de creștere, înregistrați pentru uleiurile esențiale analizate, sunt corelați negativ cu creșterea în concentrație a acestor uleiuri. Valoarea cea mai crescută a procentului de inhibare a creșterii bacteriene pentru concentrația minimă de 1%, pentru anul experimental 2021, s-a înregistrat pentru proba 82/4 (isop alb Timișoara), de 41,38% în timp ce pentru concentrația maximă testată de 16% s-a remarcat proba 82/2 (isop roz Lovrin), cu o valoare de 52,78%. Pentru anul experimental 2022, la concentrația minimă de 1%, se remarcă ca fiind cel mai eficient, uleiul 71/1 (isop roz Timișoara), cu 37,89%, iar pentru concentrația maximă de 16%, uleiul 71/6 (isop albastru Lovrin), cu 56,04%. Toate uleiurile testate în cei doi ani experimentali, la o concentrație de 16% inhibă creșterea bacteriană în proporție de peste 50%.

Concentrația minimă inhibitorie față de patogenul *Streptococcus pyogenes*, pentru toate uleiurile testate în cei doi ani experimentali, este de 1%. În privința eficacității antimicrobiene a uleiurilor analizate, observăm faptul că, toate uleiurile provenite din anul experimental 2021, sunt mult mai eficiente față de acest patogen, față de uleiurile recoltate în anul experimental următor, 2022. Se constată faptul că, valorile procentului de inhibare cresc pe măsură ce concentrația uleiului crește. Cele mai bune rezultate pentru anul experimental 2022, au fost determinate pentru isopul alb de la Timișoara (proba 71/4), la care inhibarea bacteriană a variat între 32,42% și 55,99%. În comparație, toate probele analizate pentru anul experimental 2021, cu o singură excepție (proba 82/1 – isop roz Timișoara), inhibă creșterea bacteriană în proporție de peste 50% încă de la concentrația minimă de 1%.

Valorile procentului de inhibare a tulpinilor de *Escherichia coli* sunt variabile de la un ulei la altul și dependente de concentrația testată. Creșterea bacteriană este afectată de creșterea concentrației, în ambii ani experimentali analizați, toți coeficienții de creștere bacteriană fiind în corelație negativă cu creșterea concentrației. Activitatea de inhibare bacteriană obținută în cazul acestui patogen, prezintă un tablou mai puțin eficace, față de celelalte tulpini testate anterior. Trei dintre uleiurile testate în anul experimental 2021, dovedesc un efect de potențare al tulpinii bacteriene la concentrația de 1% (uleiurile 82/1 - isop roz Timișoara, 82/2 - isop roz Lovrin și 82/4 - isop alb Timișoara), în timp ce pentru probele din anul experimental 2022, alte trei probe au același efect la concentrația minimă testată (71/3 - isop alb Lovrin, 71/5 - isop albastru Timișoara, 71/6 - isop albastru Lovrin).

În ceea ce privește activitatea uleiurilor esențiale asupra tulpinii de *Pseudomonas aeruginosa*, creșterea bacteriană este superioară celorlalte tulpini testate, trendul fiind unul de evoluție negativă, corelată pozitiv cu creșterea în concentrație testată, indiferent de anul experimental din care provin probele. Dintre toate tulpinile bacteriene testate, această tulpină s-a dovedit cea mai rezistentă la activitatea uleiurilor de isop. Valori pozitive de inhibare a creșterii bacteriene, s-au obținut doar în cazul primelor concentrații testate de 1%, pentru toate probele testate provenite din anul 2021, în timp ce pentru cele din anul 2022, doar pentru primele două probe. Toate celelalte concentrații testate, indiferent de anul experimental analizat au stimulat creșterea bacteriană, direct proporțional cu creșterea concentrației. Se remarcă uleiul 71/6 (isop albastru Lovrin), din anul 2022, care la concentrația maximă de 16%, determină o creștere bacteriană de 200%.

Creșterea bacteriană a tulpinii *Shigella flexneri*, este afectată negativ de creșterea în concentrație a uleiurilor, toate uleiurile testate dovedind un trend negativ în ceea ce privește coeficientul de creștere bacteriană, indiferent de anul experimental la care se face referință. Ca și eficacitate, cel mai bun ulei pentru anul experimental 2021, s-a dovedit uleiul 82/1 (isop roz Timișoara), care la concentrația de 16% produce o inhibare a tulpinii bacteriene de 30,65%, în timp ce pentru anul experimental 2022, cel mai eficient la aceeași concentrație, s-a dovedit a fi același ulei de isop roz din ambele locații, Timișoara (71/1) și Lovrin (71/2), care la concentrația maximă produc o inhibare a tulpinii bacteriene de 32,45%, respectiv 33,04%.

Uleiurile esențiale analizate, au avut rezultate pozitive, în ceea ce privește activitatea antimicrobiană asupra tulpinii de *Salmonella typhimurium*, exprimată ca și coeficient de creștere bacteriană, pentru ambii ani experimentali de referință. Se constată o evoluție de creștere negativă, corelată negativ cu creșterea în concentrație a uleiului, rezultate care susțin valorile de inhibare aferente.

În privința tulpinii de *Haemophilus influenzae*, rata de creștere bacteriană este influențată pozitiv de creșterea concentrației de ulei testat, în cazul celor mai multe probe testate, atât pentru anul experimental 2021 cât și pentru anul experimental 2022. Uleiul de isop stimulează creșterea bacteriană cu procente de peste 94%, pentru toate concentrațiile testate, în ambii ani experimentali. Se remarcă cu cele mai ridicate valori ale procentului de creștere bacteriană, uleiul de isop roz de la Timișoara, atât în anul 2021 cât și în anul 2022.

Candida parapsilosis a fost afectată negativ, din punct de vedere al coeficientului de creștere fungic, de către uleiurile de isop, toate uleiurile analizate au dovedit un trend negativ de creștere, concentrațiile influențând negativ coeficientul de creștere obținut. Cel mai eficient ulei pentru ambii ani experimentali, s-a dovedit a fi uleiul de isop alb de la Timișoara, la concentrația de 1% determină un coeficient de inhibare de 10,66%, pentru anul 2021 și 9,71% pentru anul 2022, în timp ce în cazul concentrației maxime de 16%, coeficient de inhibare fungic a variat între 28,14% (2021) și 34,89% (2022). Uleiurile aferente anului experimental 2022, s-au dovedit mai eficiente fungistatic, față de cele din anul experimental precedent, neînregistrându-se la nici una dintre probe, valori de inhibare negative.

Activitatea antifungică a uleiurilor de isop asupra miceliului de *Candida albicans*, caracterizată prin rata de creștere micelară, prezintă trenduri asemănătoare în toate cazurile testate, aflându-se în corelație negativă cu creșterea concentrației uleiului testat, valorile raportate pentru fiecare concentrație în parte, pe fiecare ulei analizat, fiind apropiate atât între ele cât și între anii experimentali de referință. S-au obținut valori pozitive pentru toate probele, valori corelate direct cu creșterea în cantitate a uleiurilor testate. Toate uleiurile testate s-au dovedit sensibil mai eficiente din punct de vedere al inhibării fungului *C. albicans*, față de fungul *C. parapsilosis*.

CERCETĂRI PRIVIND PROPRIETĂȚILE ANTIINFLAMATORII ALE ULEIULUI ESENȚIAL DE ISOP (*HYSSOPUS OFFICINALIS*)

Cercetările au urmărit analiza activității antiinflamatorii ale uleiurilor esențiale obținute din varietățile de isop cultivate la Lovrin, în doi din cei trei ani experimentali urmăriți, comparate cu probe de isop de la Timișoara.

S-a urmărit ca și obiective: testarea uleiurilor esențiale; determinarea activității antiinflamatorii prin metoda hemolizei induse de căldură și prin inhibarea denaturării proteinelor; stabilirea corelațiilor între parametrii supuși analizelor.

Analizând uleiurile, în funcție de anul de vegetației din care a provenit materia primă din care s-au extras, se constată că uleiul probei 81/1 provenit de la isopul roz recoltat din Timișoara din anul 2021, prezintă activitate antiinflamatorie prin protecția împotriva denaturării proteinelor încă de la o concentrație de 40 μ l/ml, spre deosebire

de uleiul aceleiași specii, din aceeași locație, dar din anul următor 2022, care prezintă o valoare pozitivă a procentului de inhibare de la concentrația de 80 $\mu\text{l/ml}$.

Deși probele 71/2 (isop roz Lovrin, 2022) și 81/2 (isop roz Lovrin, 2021), prezintă valori pozitive ale procentului de inhibare de la concentrația de 80 $\mu\text{l/ml}$, acestea sunt mai mari în cazul uleiului 81/2 (19.021%), comparativ cu 71/2 (2.830%).

Există diferențe considerabile între uleiul 81/3 (isop alb Lovrin, 2021) și 71/3 (isop alb Lovrin, 2022), privind activitatea antiinflamatorie, traduse printr-un procent de inhibare a denaturării proteinelor pozitiv, pentru proba 81/3, la o concentrație de 40 $\mu\text{l/ml}$, respectiv de 5,277%, dar negativ pentru proba 71/3 (-0.143) la aceeași concentrație. Totuși, proba 71/3 își demonstrează capacitatea de a proteja împotriva denaturării proteinelor, însă doar la concentrația de 160 $\mu\text{l/ml}$.

Uleiurile 71/4 (isop alb Timișoara, 2022), 81/4 (isop alb Timișoara, 2021), 71/5 (isop albastru Timișoara, 2022) și 81/5 (isop albastru Timișoara, 2021), toate își demonstrează activitatea antiinflamatorie încă de la concentrația de 10 $\mu\text{l/ml}$, cu valori ale procentului de inhibare a denaturării proteinelor variabile care urmăresc un trend ascendent pentru fiecare ulei în parte, o dată cu creșterea concentrației.

Dintre toate uleiurile studiate, 71/6 (isop albastru Lovrin, 2022), respectiv 81/6 isop albastru Lovrin, 2021), prezintă capacitatea de a proteja împotriva denaturării proteinelor, doar în proporție de aproximativ 10% și doar la concentrația de 320 $\mu\text{l/ml}$.

University of Life Sciences “Regele Mihai I” from Timișoara



Faculty of Agriculture

Ing. Osiceanu (Imbrea) Magdalena Cristina

DOCTORAL THESIS

- Summary -

*Research regarding the biology and cropping
technology of *Hyssopus officinalis* L.*

Conducător Științific

Prof. Dr. Ing Georgeta POP

Timișoara

2023

The use of medicinal plants for various purposes has been practiced for centuries all over the world. Among them is hyssop (*Hyssopus officinalis* L.), which, although known since antiquity and mentioned in biblical writings, due to its multiple health benefits transmitted from generation to generation as carminative, tonic, antiseptic, expectorant and cough soothing, is present in the attention of researchers around the world. The reason for choosing this topic for the doctoral thesis was due to the special value of this plant, given mainly by its multiple uses and which, at present, is very little present in the structure of medicinal plant cultures in our country.

Studies on the doctoral thesis with the title "Research on the biology and cultivation technology of *Hyssopus officinalis* L." concerned:

RESEARCH ON 1000 SEED MASS (MMB) AND GERMINATION IN HYSSOP (*HYSSOPUS OFFICINALIS*)

The objective of these researches, followed the analysis of the mass of 1000 seeds (MMB) and germination, depending on the crop year, in three color varieties (white, blue and pink). The mass of 1000 seeds is an indicator that shows the size of the seeds, provides information on their quality and culture conditions, expressing the potential as a propagation material. Due to the fact that hyssop seeds are small, and propagation is carried out both by direct sowing and by seedling, seed germination is a very important process, influenced by their quality.

The study was carried out on the three color varieties, namely: hyssop with pink flowers, hyssop with blue flowers and hyssop with white flowers, existing in the collection of the Phytotechnics discipline of the Faculty of Agriculture in Timișoara, originating from three years of cultivation.

The determination of the 1000-seed mass (MMB) was performed by counting in two repetitions 500 pure seeds, taken at random, which were weighed separately. As a result of the determination, the sum of the masses of the two repetitions was taken. Germination testing was carried out in Petri dishes at a temperature of 23°C.

The research undertaken on the mass of 1000 seeds and the germination of three varieties of hyssop color (pink, blue and white), through the findings, contribute to the improvement of information related to the technology of propagation of this species, which, although it is known since the biblical writings, in our country and in Europe is little in-depth.

The mass of 1000 seeds is a character influenced by the color variety, and depending on the year of cultivation, hyssop being a perennial plant, the highest value of the mass of 1000 seeds is obtained in the first year of vegetation, following that in the following years, the value of the mass of 1000 seeds will be reduced. Based on this finding, we recommend that for hyssop seedling production, seeds harvested in the first year of vegetation should be used.

Analyzing the contribution of the experimental factors to the achievement of the mass of 1000 seeds, the results show that the color variety contributes to the achievement of MMB with 69.8%, the crop year contributes with 13.9%, and the interaction of the two factors with 5.7%. So the biggest contribution is the color variety factor, followed by the crop year factor and their interaction.

With reference to the germination percentage, the highest values were obtained in year 1 for blue hyssop (98.07%), followed by pink hyssop (96.03%). Germination values of over 90% were also obtained in the 2nd year of cultivation, for the same color varieties (95.93%, for blue and 93.99%, for pink). It should be noted that, with white hyssop, where the highest mass of 1000 seeds was obtained, the germination percentage was recorded with values between 70.05% in the 3rd year of culture and 80.01%, in the first year of culture, values far below the average of experience (86.34%).

Factor A (color variety) contributes to germination in proportion of 70.23%, while factor B (year of cultivation) contributes 27.7%, and the interaction of the two factors with 2.043%.

RESEARCH ON PLANT HEIGHT AND WEIGHT, GREEN AND DRY MASS PRODUCTION AND DRY MATTER CONTENT OF HYSSOP (*HYSSOPUS OFFICINALIS*)

Hyssop being a plant from which herb is harvested, the objective of the research presented in this chapter, focused on how elements that contribute to the production of herb (plant height, their weight, green mass production,

dry leaf production and dry matter content), are influenced by the growing conditions, the hyssop color variety and the growing year.

The researches were carried out on the three color varieties, namely: pink-flowered hyssop, blue-flowered hyssop and white-flowered hyssop, existing in the collection of the Phytotechnics discipline within the Faculty of Agriculture of the "King Mihai I" University of Life Sciences in Timișoara, originating from three years of cultivation. The observations were carried out according to the specific methodology for such experiences, namely by measuring the waist, the grass harvest and weighing it in the fresh state, they were after drying. The observations were carried out in the flowering phenophase of hyssop plants, recommended by the specialized literature.

The experiment was carried out in SCDA Lovrin, the field of medicinal plants, located on a cambic chernoziom type soil, weakly glazed.

The experience was a comparative culture with three varieties of hyssop color (pink, blue and white), with the aim of tracking the amount of herb that can be obtained depending on the year of cultivation, hyssop being cultivated as a perennial plant.

For the processing and interpretation of the experimental results, the following programs were used: for analysis of variance - statistics (ANOVA), MSTATC, for correlations and regressions - statistics - Regressions and Graphs and procedures with formulas regarding the contribution of factors and DLs - in EXCEL, Cluster analysis, and for the analysis of the main components the STATISTICA program was used.

The obtained results highlight that:

The height of the plant depending on the color variety, it decreases in value from variant 1 (pink hyssop) to variant 2 (blue hyssop), after which it increases. So we have a downward trend, from v1 to v2, and an upward trend from v2 to v3. The plant height values obtained for the three variants were 58.31 cm for v1, 56.64 cm for variant 2 and 66 cm for variant 3, so the highest value was obtained for variant 3 (white hyssop).

The height of the plant according to the year of cultivation, increases from year 1 to year 3, thus we have an upward trend according to the year of production. The plant height values varied between 58.6 cm (year 1) and 62.3 cm (year 3). The differences between years are highly significant ($p < 0.001$).

During the three years of cultivation, the height of the plant has an upward trend, regardless of the variant. The highest value of the plant height is obtained at v3 (white hyssop), and the lowest at v2 (blue hyssop).

Comparing the years, it can be deduced that the highest value for plant height was obtained in the 3rd year of cultivation, and the lowest in the 1st year of cultivation.

Regarding the contribution of the factors to the achievement of plant height, it can be stated that:

- factor A (color variety), has a very significant action, i.e. between the three variants followed in the experiment, there are very significant differences in terms of height;
- Factor B (the year of cultivation), has a very significant action, so the difference between the years of cultivation, hyssop being a perennial plant, is very significant;
- The AxB interaction presents a very significant action. The plant height of the three variants reacted differently in the three experimental years.

Plant weight it decreases in value from variant 1 (pink hyssop), to variant 2 (blue hyssop), after which it increases. We thus have a downward trend, from v1 to v2 and an upward trend from v2 to v3. The plant weight values obtained for the three variants were: 477.34 g for v1, 408.7 g for variant 2 and 491 g for variant 3. The plant weight with the highest value was obtained for variant 3 (white hyssop).

Depending on the crop year, the weight of the plant increases from year 1 to year 3, so we have an upward trend depending on the year of production. Plant weight values varied between 390 g (year 1) and 540 g (year 3). Differences between years are statistically assured as highly significant ($p < 0.001$). The highest value was obtained in the 3rd year of production of 540 g.

Regarding the contribution of the factors to the achievement of plant weight, it can be stated that the color variety has a very significant action, as well as the year of cultivation, the difference between the years of cultivation is statistically ensured as very significant. Therefore, the weight of the plant in the three variants recorded different values in the three experimental years.

Production of green mass/plantit decreases in value from pink hyssop to blue hyssop, then increases. So we have a downward trend from v1 (pink hyssop) to v2 (blue hyssop) and an upward trend from v2 (blue hyssop) to v3 (white hyssop). The green mass/plant production values obtained in the three color varieties were as follows: 1.7 kg in v1 (pink hyssop), 1.52 kg in v2 (blue hyssop) and 1.8 kg in v3 (white hyssop). The highest amount of green mass/plant is obtained in white hyssop.

Analyzing the crop year, the production of green mass increases from year 1 to year 3, so we have an upward trend depending on the year of production. The values of green mass production/plant varied between 1.2 g (year 1) and 2.2 g (year 3). Differences between years are statistically assured as highly significant ($p < 0.001$)

In the three experimental years, the production of green mass/plant has an upward trend, regardless of the color variety. The highest value of green mass production/plant. it is obtained at v3 (white hyssop), and the lowest at v2 (blue hyssop). It should be noted that, in pink and white hyssop, the production of green mass/plant has close values.

Comparing the years of cultivation, it can be deduced that the highest amount of green mass/plant was obtained in the 3rd year of production, and the lowest in the 1st year of cultivation.

Production of dry leaves, decreases in value, from variant 1 to variant 2, after which it increases. So we have a downtrend from v1 to v2 as well as an uptrend from v2 to v3. The values of the production of dry leaves, obtained in the three variants, were 0.25 kg in v1, 0.20 kg in variant 2 and 0.24 kg in variant 3. It should be noted that the highest value of the production of dry leaves is obtained in variant 1, followed by variant 3, in the two variants close values are obtained.

The production of dry leaves increases from year 1 to year 3, thus we have an upward trend depending on the year of production. Leaf production values ranged between 0.18 kg (year 1) and 0.30 kg (year 3). The differences between years are highly significant ($p < 0.001$).

In the three years of production, the production of dry leaves has an upward trend, regardless of the variant. The highest value of the production of dry leaves is obtained at v1 (variant 1), and the lowest at v2 (variant 2). In year 2 and year 3 of production, the dry leaf production values obtained at v1 and v3 are close.

Comparing the years, we notice that the highest value for the production of dry leaves was obtained in the 3rd year of production, and the lowest in the first year of production.

- factor A (the variant), has a very significant action, that is, between the three variants followed in the experiment, there are very significant differences in terms of the production of dry leaves;
- Factor B (year), has a very significant action, so the difference between production years is very significant;
- The AxB interaction presents a very significant action. So the production of leaves in the three variants reacted differently in the three experimental years.

Dry matter content(SU) decreases in value from pink-flowered hyssop to blue-flowered hyssop, then increases. The dry substance content values obtained for the three varieties of hyssop were 23.7% for pink hyssop, 23.3% for blue hyssop and 23.4% for white hyssop, so the highest value was obtained for pink hyssop.

Depending on the crop year, the dry matter content values varied between 22.4% [year 1] and 24.6% [year 3]. Differences between years are highly significant [$p < 0.001$]

RESEARCH ON THE CHEMICAL COMPOSITION OF HYSSOP (HYSSOPUS OFFICINALIS) ESSENTIAL OIL

The research aimed at the extraction of hyssop essential oil from samples subjected to multiparametric analyses, as well as the establishment of biologically active compounds, by specific methods.

The following objectives were pursued: the harvesting of the biological material at the optimal time, the extraction of the essential oil, the determination of the chemical composition.

The plants were harvested during the optimal vegetation period, when more than 50% of the inflorescences were in bloom. Samples were collected for each of the three cultivated forms: pink -*H. officinalis*f.ruber, white -*H. officinalis*f.egg white and blue -*H. officinalis*f.cyaneus. Samples were taken from two different locations: Timișoara Didactic Station (SDT) and Lovrin Agricultural Research and Development Station.

The extraction of essential oils was carried out from the dry mass of the plants (herb), respectively the portions of the stem that include the inflorescences and leaves, without the lignified basal part.

The essential oil extraction was performed for the dry aerial parts of the plants, using hydrodistillation equipment (Clevenger extractor, experimental model, Timișoara, Romania). The resulting essential oils and aromatic water mixture were separated using a separatory funnel. Pure essential oils were stored in glass vials at +4°C until further analysis.

Chemical characterization was done using a Shimadzu QP 2010Plus gas chromatograph equipment, Columbia, SC, USA with mass spectrometer (GC/MS) and AT WAX capillary column (features 30 m × 0.32 mm × 1 μm).

Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 1 ml/min with a column pressure of 42 kPa. The separation of the components was carried out according to the following schedule: 40 oC for 1 min at a rate of 5 oC/min at 210oC for 5 min. The injector and ion source temperatures were 250 oC and 220 oC, respectively. The injection volume was 1 μL of essential oil hexane solution with a split ratio of 1:50. The NIST 5 Wiley 275 database was used to identify volatile compounds by calculating the linear retention index (LRI)

The results of the analyzes regarding the chemical composition of the oils, for the two experimental years analyzed, show close values. The three major compounds identified were, in all cases, pinocamphona, isopinocamphona and beta-pinene.

For the experimental year 2021, pinocamphona was the majority compound only in the case of pink oil from the experimental batch in Timișoara, reaching a value of 45.966%. White hyssop from the same location had close values for the first two major compounds (pinocamphona 31.914% and isopinocamphona 32.001%). In the other four analyzed cases, isopinocamphona had higher percentage values than pinocamphona, clearly dominating in the case of the blue oil from Lovrin (isopinocamphona 54.750% and pinocamphona 6.093%).

Beta-pinene had values between 9.447% (Timișoara pink hyssop) and 15.846% (Lovrin blue hyssop). All the oils from the Lovrin experimental field, regardless of the genotype, showed a higher percentage of isopinocamphona than that of pinocamphona.

Other chemical compounds identified in a percentage greater than 1%, for all genotypes studied in the experimental year 2021, were: sabinenes, beta-myrcene, beta-phellandrene, cyclohexene, caryophyllene, gamma-elemene, myrtenol, germacrene D.

For the experimental year 2022, pinocamphona was the majority compound, in the case of oils from pink hyssop, harvested from both locations, respectively 46.741% Timișoara and 41.764% Lovrin. Isopinocamphona, the majority complementary compound, presents in this case values of 20.333% for the oil harvested from Timișoara and 18.029% for the one from Lovrin.

In the oil from blue hyssop, we observe, as in 2021, as the dominant compound, isopinocamphona with 41.769% for the Lovrin area and 30.073% for the Timișoara area.

The oil from the white hyssop from both Timișoara and Lovrin had values close to those determined in the previous experimental year, both in terms of the percentage of the majority compounds and in terms of the majority main compound.

The third major terpenic compound, beta-pinene, reached similar values for five of the six oil samples, with percentages ranging from 13.252% to 14.085%. The pink hyssop from Timișoara had a percentage below 10%, because the first two major compounds added together reached the highest percentage, of all the analyzed samples, of over 67%.

Other minor terpenic chemotypes, identified in a percentage higher than 1% for all studied genotypes, were: bicyclohexane, beta-myrcene, beta-phellandrene, cyclohexene, caryophyllene, alloaromadendrene, gamma-elemene, germacrene D.

RESEARCH ON THE ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF HYSSOP (*HYSSOPUS OFFICINALIS*) ESSENTIAL OIL

The research aimed to analyze the antimicrobial activity of essential oils obtained from different varieties of hyssop, originating from two distinct locations, in two different experimental years, 2021 and 2022. The biological activity was evaluated using the microdilution method.

The following objectives were pursued: testing of essential oils; determination of their biological activity by the microdilution method; establishing correlations between the analyzed parameters.

The extraction of the analyzed oils was carried out from the dry aerial parts of the plant of hyssop, as presented in the previous chapter. Different characteristics were obtained from the three varieties of hyssop from the II (2021) and III (2022) years of cultivation, harvested from two different areas, the Timișoara Teaching Station (SDT) and the Lovrin Agricultural Research and Development Station.

Broth microdilution method

The reference microbial strains (ATCC) used in this study were obtained from the culture collection of the Microbiology Laboratory of the Interdisciplinary Research Platform within the "King Mihai I" University of Life Sciences in Timișoara, where this stage of research is taking place.

The essential oil samples were tested on the following reference strains: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Shigella flexneri* (ATCC 12022), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Haemophilus influenzae* type B (ATCC 10211), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) and *Candida albicans* (ATCC 10231).

The MIC is defined as the lowest concentration tested that produces no visible, detectable growth of microorganisms. Previous research described the method as microbial mass loss by measuring OD by spectrophotometry according to ISO 20776-1:2019

All the oils tested in the two experimental years 2021 and 2022 show antimicrobial activity against the *Staphylococcus aureus* strain, even from the minimum concentration tested, i.e. 1%. All growth coefficients, recorded for the analyzed essential oils, are negatively correlated with the increase in concentration of these oils. The highest value of the percentage of inhibition of bacterial growth for the minimum concentration of 1%, for the experimental year 2021, was recorded for sample 82/4 (white hyssop Timișoara), of 41.38%, while for the maximum tested concentration of 16%, sample 82/2 (pink hyssop Lovrin) was noted, with a value of 52.78%. For the experimental year 2022, at the minimum concentration of 1%, the oil 71/1 (Timișoara pink hyssop) stands out as the most effective, with 37.89%, and for the maximum concentration of 16%, the oil 71/6 (Lovrin blue hyssop), with 56.04%. All oils tested in the two experimental years at a concentration of 16% inhibited bacterial growth by more than 50%.

The minimum inhibitory concentration against the *Streptococcus pyogenes* pathogen, for all oils tested in the two experimental years, is 1%. Regarding the antimicrobial effectiveness of the analyzed oils, we observe that all the oils from the experimental year 2021 are much more effective against this pathogen than the oils harvested in the following experimental year, 2022. It is noted that the inhibition percentage values increase as the concentration of the oil increases. The best results for the experimental year 2022 were determined for the white hyssop from Timișoara (sample 71/4), where bacterial inhibition varied between 32.42% and 55.99%. In comparison, all the samples analyzed for the experimental year 2021, with one exception (sample 82/1 – Timișoara pink hyssop),

The percentage inhibition values of *Escherichia coli* strains are variable from one oil to another and dependent on the tested concentration. Bacterial growth is affected by increasing concentration, in both experimental years analyzed, all bacterial growth coefficients being negatively correlated with increasing concentration. The bacterial inhibition activity obtained in the case of this pathogen presents a less effective picture compared to the other previously tested strains. Three of the oils tested in the experimental year 2021, prove a potentiating effect of the bacterial strain at a concentration of 1% (oils 82/1 - pink hyssop Timișoara, 82/2 - pink hyssop Lovrin and 82/4 - white hyssop Timișoara), while for the samples from the experimental year 2022, three other samples have the same effect at the minimum concentration tested (71/3 - white hyssop Lovrin,

Regarding the activity of the essential oils on the strain of *Pseudomonas aeruginosa*, the bacterial growth is superior to the other tested strains, the trend being one of negative evolution, positively correlated with the increase

in tested concentration, regardless of the experimental year from which the samples come. Of all the bacterial strains tested, this strain proved to be the most resistant to the activity of hyssop oils. Positive values of inhibition of bacterial growth were obtained only in the case of the first tested concentrations of 1%, for all tested samples from the year 2021, while for those from the year 2022, only for the first two samples. All other concentrations tested, regardless of the experimental year analyzed, stimulated bacterial growth, directly proportional to the increase in concentration.

The bacterial growth of the *Shigella flexneri* strain is negatively affected by the increase in concentration of the oils, all tested oils showing a negative trend in terms of the bacterial growth coefficient, regardless of the experimental year to which reference is made. As for effectiveness, the best oil for the experimental year 2021 proved to be oil 82/1 (pink hyssop Timișoara), which at a concentration of 16% produces an inhibition of the bacterial strain of 30.65%, while for the experimental year 2022, the most effective at the same concentration, it turned out to be the same pink hyssop oil from both locations, Timișoara (71/1) and Lovrin (71/2), which the maximum concentration produces an inhibition of the bacterial strain of 32.45% and 33.04%, respectively.

The analyzed essential oils had positive results, in terms of antimicrobial activity on the strain of *Salmonella typhimurium*, expressed as bacterial growth coefficient, for both reference experimental years. A negative growth trend is observed, negatively correlated with the increase in oil concentration, results that support the related inhibition values.

Regarding the strain of *Haemophilus influenzae*, the bacterial growth rate is positively influenced by the increase in the concentration of the tested oil, in the case of most of the tested samples, both for the experimental year 2021 and for the experimental year 2022. Hyssop oil stimulates the bacterial growth with percentages above 94%, for all tested concentrations, in both experimental years. The pink hyssop oil from Timișoara stands out with the highest values of the percentage of bacterial growth, both in 2021 and in 2022.

Candida parapsilosis was negatively affected, from the point of view of the fungal growth coefficient, by the hyssop oils, all analyzed oils showed a negative growth trend, the concentrations negatively influencing the growth coefficient obtained. The most effective oil for both experimental years proved to be white hyssop oil from Timișoara, at a concentration of 1% it causes an inhibition coefficient of 10.66% for the year 2021 and 9.71% for the year 2022, while in the case of the maximum concentration of 16%, the fungal inhibition coefficient varied between 28.14% (2021) and 34.89% (2022). The oils from the 2022 experimental year proved to be more fungistatically effective than those from the previous experimental year, with no negative inhibition values being recorded in any of the samples.

The antifungal activity of hyssop oils on the mycelium of *Candida albicans*, characterized by the rate of mycelial growth, shows similar trends in all tested cases, being in negative correlation with the increase in the concentration of the tested oil, the values reported for each individual concentration, on each analyzed oil, being close both to each other and between the reference experimental years. Positive values were obtained for all samples, values directly correlated with the increase in quantity of the tested oils. All tested oils were significantly more effective in inhibiting *C. albicans* than *C. parapsilosis*.

RESEARCH ON THE ANTI-INFLAMMATORY PROPERTIES OF HYSSOP (*HYSSOPUS OFFICINALIS*) ESSENTIAL OIL

The research aimed to analyze the anti-inflammatory activity of the essential oils obtained from hyssop varieties grown in Lovrin, in two of the three experimental years followed, compared with hyssop samples from Timișoara.

The following objectives were pursued: testing of essential oils; determination of anti-inflammatory activity by the method of heat-induced hemolysis and inhibition of protein denaturation; establishing correlations between the analyzed parameters.

Analyzing the oils, depending on the year of vegetation from which the raw material from which they were extracted, it is found that the oil of sample 81/1 from pink hyssop harvested from Timișoara in 2021, shows anti-inflammatory activity by protecting against protein denaturation from a concentration of 40 $\mu\text{l/ml}$, unlike the oil of

the same species, from the same location, but from the following year 2022, which shows a positive percentage value of inhibition from the concentration of 80 $\mu\text{l/ml}$.

Although samples 71/2 (pink hyssop Lovrin, 2022) and 81/2 (pink hyssop Lovrin, 2021) show positive percentage inhibition values from the concentration of 80 $\mu\text{l/ml}$, they are higher in the case of oil 81/2 (19.021%) compared to 71/2 (2.830%).

There are considerable differences between oil 81/3 (white hyssop Lovrin, 2021) and 71/3 (white hyssop Lovrin, 2022), regarding the anti-inflammatory activity, translated by a positive protein denaturation inhibition percentage for sample 81/3, at a concentration of 40 $\mu\text{l/ml}$, respectively 5.277%, but negative for sample 71/3 (-0.143) at the same concentration. However, sample 71/3 demonstrates its ability to protect against protein denaturation, but only at the concentration of 160 $\mu\text{l/ml}$.

The oils 71/4 (white hyssop Timișoara, 2022), 81/4 (white hyssop Timișoara, 2021), 71/5 (blue hyssop Timișoara, 2022) and 81/5 (blue hyssop Timișoara, 2021) all demonstrate their anti-inflammatory activity from a concentration of 10 $\mu\text{l/ml}$, with variable protein denaturation inhibition percentage values that followed I see an upward trend for each oil as the concentration increases.

Of all the oils studied, 71/6 (blue hyssop Lovrin, 2022), respectively 81/6 blue hyssop Lovrin, 2021), shows the ability to protect against protein denaturation, only in a proportion of about 10% and only at the concentration of 320 $\mu\text{l/ml}$.