

تأثير المستخلص الكحولي لنبات الحامول *Custuca campestris* yenker
في الدور اليرقي و الدور العذري لذبابة التدويد
Calliphora vicina Rob.Desvoidy (1830) (Calliphoridae: Diptera)

أسماء عبد الزهرة سبع العيداني و أمل علي ياسين
علوم الحياة - كلية التربية - جامعة البصرة

الخلاصة

حضر المستخلص الكحولي لنبات الحامول *Custuca campestris* و تم دراسة الفعالية البيولوجية له في الدور اليرقي و الدور العذري لذبابة التدويد *Calliphora vicina*. أظهرت النتائج أن الطور اليرقي الأول كان الأكثر حساسية بينما كان الطور اليرقي الثالث الأكثر مقاومة للمستخلص، سجلت أعلى نسبة هلاك للأطوار اليرقية في التركيز 75% و بلغت 86.66% و 63.33% و 53.33% للطور اليرقي الأول و الثاني و الثالث على التوالي. كما بينت النتائج تأثير الدور العذري بالمستخلص الكحولي، حيث سبب المستخلص هلاك للعذارى و إنخفاض أوزانها فضلاً عن تشوه البالغات الخارجة منها من تقزم و عدم إنتظام الأجنحة، وبلغت أعلى نسبة لهلاك العذارى 63.33% في التركيز 75%، بينما بلغ أقل معدل لأوزان العذارى 0.024 غم/30 عذراء في التركيز نفسه مقارنة بتلك في معاملة السيطرة التي بلغ معدل أوزانها 0.65 غم، وبلغت أعلى نسبة تشوه للبالغات 36.66% و أعلى نسبة لهلاك البالغات الخارجة 40% في التركيز نفسه.

1- المقدمة

الجسم (Hall, 2001) فضلاً عن قلة الإنتاج وفقدان الحيوان بسبب الإصابة (Cocke, 1980)، وفي الإنسان تكمن الأهمية الطبية ليرقات ذبابة *C. vicina* في كونها طفيليات اجبارية على الأنسجة الحية مسببة ضرراً بالغا وتشوهات اذ تغزو الجيوب الأنفية والفم والعيون والجلد والكلية والجهاز الهضمي (Hall, 2001)، فقد سجلت حالات تدويد بولي واحشائي (Granz et al., 1975)، وفي الهند سجل Bapat (2000) حالة تدويد اذني لطفلة في الشهر التاسع من العمر، وسجلت اول حالة تدويد للجروح في اوربا وكانت مترافقة مع الاصابة ببكتريا *Aeromonas hydrophila* (Delhase et al., 2001). و نظرا لهذه الأهمية ليرقات التدويد فقد أستخدمت مبيدات كيميائية مختلفة في مكافحة ذباب التدويد مثل الدرين وكلوردين ولندان التي تعتبر مواد تراكمية سامة للإنسان و الحيوان (منصور، 1982؛ إسماعيل و متولي، 1982) فضلاً عن عدم تحملها و بقائها لفترة طويلة في البيئة (شعبان و الملاح، 1993) و إمكانية تداخلها مع المادة

تسبب يرقات ذبابة ال تدويد *Calliphora vicina* التدويد Myiasis للإنسان و الهاشية (French et al., 1996; Hutchinson, 1998)، و يعرف التدويد بأنه غزو أعضاء و أنسجة الإنسان و الحيوانات الفقرية بيرقات رتبة ثنائية الأجنحة Diptera التي تسمى Maggots التي تتغذى لفترة - على الأقل - على الأنسجة الحية أو النخرة أو الميتة أو على الغذاء الذي يتناوله المضيف كما في حالة التثغيف المعدي و يتسبب بأضرار لهذه الأعضاء و الأنسجة، و تختلف هذه الأضرار في شدتها و في حالة الإصابة الشديدة قد تؤدي إلى الوفاة (Zumpt, 1965) وتعد عائلة Calliphoridae المسبب الرئيس للتدويد في الماشية و احيانا في الانسان (French et al., 1992; Hutchinson, 1998)، فقد سجلت حالة أصابة بيرقات *C. vicina* في الزواحف في اوربا من قبل Knotek et al., (2005)، ويشمل الضرر للماشية من خلال اصابة سطح الجلد او داخل تجاويف

أُتُبعت طريقة عبد الفتاح (1989) لدراسة تأثير المستخلصات في الأطوار اليرقية حيث تمت معاملة يرقات الطور الأول والثاني والثالث كل على حدة بالمستخلص الكحولي لنبات الحامول *C. campestris* و حسب التواكيز 75% و 50% و 25% و 10%، حيث أخذت 10 يرقات لكل طور و بواقع ثلاث مكررات، و تم وضعها في أطباق بتري ذات قطر 9 سم حاوية على الغذاء الخاص باليرقات المتكون من اللحم المفروم و أضيف له المستخلص، ثم غطيت الأطباق بأكياس السليكون المثقب و ربطت بواسطة رباط من المطاط منعاً لخروج اليرقات، أما معاملة المقارنة فقد أضيف الماء المقطر فقط، حضنت الأطباق بدرجة حرارة 28 ± 2 م و رطوبة نسبية (50 – 60) %، سجلت النسبة المئوية للهلاكات لكل طور بعد إنتهاء الطور نفسه و صححت النسبة المئوية حسب معادلة Schneider and Orell Formula (شعبان و الملاح، 1993).

كما تم اختيار 30 عذراء بشكل عشوائي لكل معاملة من معاملات الدور اليرقي التي وصلت فيها اليرقات الى الدور العذري، وتم تسجيل معدل اوزانها والحالات غير الطبيعية والنسب المئوية للهلاكات لها .
التحليل الإحصائي

تم استخدام التصميم العشوائي الكامل C. R. D، حلت النتائج بواسطة نظام SAS و تمت مقارنة المتوسطات حسب طريقة أقل فرق معنوي المعدلة R. L. S. D و تحت مستوى إحتمال 0.05 (الراوي و خلف الله، 1980).

3-النتائج و المناقشة

استخدم مذيب الكحول الأيثيلي القطبي في الاستخلاص اذ ان يستخلص المركبات الفعالة مثل المركبات الفينولية و أملاح القلوينات و الكثير من أشباه السكريات (Tyler et al., 1988 ;Goowdin and Mercer, 1985) اذ تكون هذه المركبات السامة مواد مانعة للتغذية تمنع اليرقات من التغذية فتموت جوعاً ، و تكون م وثرة على إنزيم Protase وغشاء القناة الهضمية الوسطى فضلاً عن تقليل مستوى السكر و البروتين الكلي في الهيموليمف (Klocke and Chan, 1982).

حيث يوضح الجدول رقم 1 تأثير المستخلص الكحولي لنبات الحامول *Cuscuta campestris* في

الوراثية للكائنات الحية (Kacmar et al., 1999). لذلك استخدمت مؤخراً مبيدات ذات أصل نباتي (Bowers,1994) تكون مؤثرة على سلوك الحشرات كالتأثير الطارد أو المانع للتغذية (Schoonhoven, 1982) أو مؤثرة على الكفاءة التناسلية (Bodhada and Borle, 1985; Raju et al., 1990). لذا هدفت الدراسة الحالية لدراسة تأثير المستخلص الكحولي لنبات الحامول *Cuscuta campestris* في الدور اليرقي و الدور العذري لذبابة التدويد *C. vicina* كبداية عن المبيدات الكيميائية.

2-المواد و طرائق العمل

1. العوامل البيئية

تحضير المستخلص الكحولي لنبات الحامول

تم جمع عينات نبات الحامول (*Cuscuta campestris* yenker) للفترة من 15\1\2009 ولغاية 15\1\2009 من حديقة كلية التربية - جامعة البصرة منطقة كرمة علي، وجمع النبات بأكمله اذ ان نبات الحامول نبات طفيلي يتكون من سيقان خيطية الشكل صفراء صغيرة عديمة الاوراق، جففت العينات وطحنت وحفظت لحين الاستعمال .

أستخدم مذيب الكحول الأيثيلي Ethanol كمذيب قطبي (Harborne, 1984)، و تم الإستخلاص بإتباع طريقة Ladd et al. (1978) و ذلك بوضع 20 غم من المسحوق النباتي الجاف لنبات الحامول *Cuscuta campestris* في أوعية ورقية وثقوبية Soxhlet extractor وضعت في جهاز الإستخلاص باستخدام 200 مل من الكحول الأيثيلي بدرجة حرارة 40 °C لمدة 24 ساعة ، و أعيدت العملية عدة مرات للحصول على كمية كافية من الخلاصة، جفف المستخلص بواسطة المجفف الدوار Rotary Evaporator في درجة حرارة لا تتجاوز 50 °C ، و حفظت في قنينة محكمة مغلقة بعيداً عن الضوء في درجة حرارة 20 °C - لحين الإستعمال.

تأثير المستخلص الكحولي لنبات الحامول *campestris* *Cuscuta* في الدور اليرقي و الدور العذري لذبابة التدويد *Calliphora vicina*

نسب هلاك الأطوار اليرقية الثلاثة لذبابة الـ *Calliphora vicina* ، إذ كان تأثيره واضحاً في الطورين الأول والثاني وقل تأثيراً في الطور الثالث ، إذ تمتاز الأطوار اليرقية الأولى كونها أكثر تحسناً من الأطوار المتقدمة .

كما أوضحت النتائج وجود فروق معنوية بين التراكيز المستخدمة للمستخلص و سجلت أعلى نسب هلاك لليرقات في التركيز 75% و بلغت 90% و 60% و 53.33% للطور اليرقي الأول و الثاني و الثالث على التوالي، بينما حدثت أوطاً نسب هلاك في التركيز 10% و بلغت 56.66% و 43.33% و 30% للأطوار نفسها على التوالي.

و في هذا المجال أشارت دراسات أخرى إلى فعالية مستخلصات نباتية مختلفة في نسب هلاك الأطوار اليرقية لأنواع أخرى من الذباب، فقد ذكر El- Shazly *et al.* (2000) أن مستخلص الكحول الأيثيلي لنبات الدفلة *Nerium oleander* أثرت في معدل هلاك يرقات أطوار الثالث لذبابة التدويد *Chrysomya albiceps* ، أشارت الفرحاني (2001) أن المستخلص الكحولي لنبات السبج *Melia azedarach* أثر في معدل هلاك الأطوار اليرقية الثلاثة للذبابة المنزلية *Musca domestica* ، كما ذكر Sukontason *et al.* (2004) أن المستخلص الإيثانولي لأوراق اليوكالبتوس سبب هلاك يرقات الطور الثالث لكل من الذبابة المنزلية *Musca domestica* و ذبابة التدويد *Chrysomya megacephala* ، و أشارت العيداني (2006) إلى أن المستخلص الكحولي لأوراق نبات الحناء *Lawsonia inermis* L. و قشور الجفت *Quercus infectoria* Oliv أثرت في معدل هلاك الأطوار اليرقية الثلاثة للذبابة الزرقاء *Lucilia sericata* ، و أشار الثامري (2006) أن المستخلص الإيثانولي لنبات *Eucalyptus camaldulensis* و نبات الحميض *Rumex dentatus* أثرت في معدل هلاك الأطوار اليرقية للذبابة المنزلية، كذلك أوضحت نجم (2006) أن المستخلص الإيثانولي لنبات الشنان *Haloxylon* sp أثرت في معدل هلاك الأطوار اليرقية الثلاثة لذبابة التدويد *Calliphora vicina* ، و ذكرت شاكر (2006) أن المستخلص الكحولي لنبات التبغ *Nicotina tabacum* L. أثرت في معدل هلاك الأطوار اليرقية الثلاثة لذبابة التدويد *Chrysomya albiceps* .

يوضح الجدول رقم 2 تأثير المستخلص الكحولي لنبات الحامول في نسب هلاك العذارى ومعدل أوزانها، و أظهرت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية بين التراكيز المستخدمة حيث سجل التركيز 75% أقل معدل لأوزان العذارى و بلغ 0.116 غم/30 عذراء، و بلغ أعلى معدل لهلاك العذارى 60% في التركيز نفسه ، كما تأثرت البالغات الخارجة بالمستخلصات إذا كانت مشوهة تعاني من التقزم وقصر الأجنحة مما سبب هلاكها و سجلت أعلى نسب هلاك للبالغات الخارجة في التركيز 75% و بلغت 40% بينما بلغت أعلى نسب تشوهها 33.33% في التركيز نفسه.

و قد يعود السبب في تأثير المستخلصات إلى وجود مشابهاة هرمونية في المستخلصات أدت إلى حدوث هذه التشوهات (Halify and Al-Zubaidi, 1989)، كذلك فإن السبب في خفض أوزان العذارى يعود إلى عدم جاهزية الغذاء بسبب تفاعل المركبات السامة للمستخلص مع الغذاء خاصة البروتين (المنصور، 1995)، و قد تتعارض هذه المركبات الفعالة مع نظام الغدد الصم لليرقات فتؤثر على هرمون الصبا المسؤول عن عملية التطور و التشكل في الحشرات (Wyatt and Davey, 1996) لذلك لا تتمكن اليرقات من الإنسلاخ و التطور للطور التالي لعدم كفاية المادة الغذائية داخل جسمها فتتعرض قبل إكمال نموها فتنتج عذارى قصيرة مشوهة قليلة الأوزان و تفشل البالغات في الخروج منها او قد تخرج بالغات مشوهة متقزمة قصيرة الأجنحة مما بالتالي هلاكها.

أشارت دراسات سابقة لتأثير مستخلصات نباتية مختلفة في الدور العذري لأنواع أخرى من الذباب ، فقد ذكر الفرحاني (2001) أن المستخلص الكحولي لنبات السبج سبب خفض أوزان عذارى الذباب المنزلي، و ذكر المنصور واخرون (2004) أن الزيوت الطيارة لنبات القرنفل سببت هلاك وخفض أوزان عذارى الذباب المنزلي كما أثرت في هلاك البالغات الخارجة ونسب التشوه فيها . و بينت العيداني (2006) أن المستخلص الكحولي لأوراق نبات الحناء و قشور الجفت سببت خفض أوزان عذارى الذبابة الزرقاء *L. sericata* ، و ذكرت نجم (2006) أن المستخلص الكحولي و مستخلص الهكسان لنبات الخروع *Ricinus communis* سبب خفض أوزان عذارى ذبابة التدويد *C. vicina* ، و أشار الثامري (2006) أن المستخلص الإيثانولي لنبات الحميض و

مشوهة ذات أجنحة قصيرة.

مستخلص الهكسان لنبات اليوكالبتوس سببت خفض أوزان
عذارى الذباب المنزلي و سببت خروج بالغات قصيرة

جدول: 1 تأثير المستخلص الكحولي لنبات الحامول *Cuscuta campestris* في معدل هلاك الأطوار اليرقية لذبابة التدويد
C.vicina

تراكيز المستخلص الكحولي الأطوار اليرقية	%10	%25	%50	%75
الأول	56.66	66.66	73.33	90
الثاني	43.33	50	56.66	60
الثالث	30	33.33	36.33	53.33

R.L.S.D. التراكيز = 5.77

R.L.S.D. الطور = 2.64

جدول : 2 تأثير معاملة اليرقات بالمستخلص الكحولي لنبات الحامول *C. campestris* على نسب هلاك ومعدل أوزان الدور
العذري و معدل خروج البالغات

تراكيز المستخلص	% هلاك العذارى	معدل أوزان العذارى (غم)*	% هلاك البالغات الخارجة	% المتشوهات
المقارنة	0	0.65	0	0
%75	60	0.116	40	33.33
%50	53.33	0.264	33.33	30
%25	46.66	0.312	20	23.33
%10	36.66	0.394	13.33	20
R.L.S.D.	2.57	0.025	2.64	2.58

* كل رقم يمثل معدل وزن 30 عذرا

المصادر

الراوي، خاشع محمود و عبد العزيز، خلف الله (1980).

تصميم و تحليل التجارب الزراعية، دار الكتب

للطباعة و النشر، جامعة الموصل، 488 صفحة.

شاكر، هيا عبد (2006) . دراسة تأثير المستخلصات

النباتية للتبغ *Nicotina tabacum* L. والحرمل*Peganum harmala* L. في نسب هلاك البيض

والأطوار اليرقية لحشرة ذبابة التدويد

Chrysomya albiceps (Widemann)

.رسالة ماجستير -كلية العلوم-جامعة

البصرة، 94صفحة.

إسماعيل، عبد المعز أحمد و متولي، محمود عبد الرحمن
(1982). صحة الحيوان. مطبعة جامعة الموصل،

298 – 320.

الثامري، علاء ناظم (2006). تأثير بعض المستخلصات

النباتية في بعض جوانب حياتية حشرة الذبابة

المنزلية *Musca domestica*

L.(Muscidae:Diptera). رسالة ماجستير –

كلية التربية – جامعة البصرة، 102 صفحة.

- 117 ماجستير، كلية العلوم، جامعة البصرة،
صفحة.
- Bapat ,S.S.(2000).Neontal Myiasis .Pediatrics
106 (1):6 .
- Bodhada, S. N. and Borle, M. M. (1985).
Sterility effect of some Indigenous plant
material on Cucurbit fruit fly. Proc. Natt.
Seminor Behav. Physiol. Appr. Mgmt.
Crop. Pst., 38- 46.
- Bowers, W. S. (1992). Bioration approaches
for insect control.
- Cocke , J. (1981) . New advances against the
screw worm . Texas , Texas A and M
University .
- Delhase,L. , Bourel, B. and Scala ,L.(2001).
Case report: recovery of *Calliphora*
vicina
first-instar larvae from human
traumatic wound associated with a
progressive necrotizing bacterial
infection
.Am.J.Trop.Med.Hyg.64:(3,4),159-161.
- El-Shazly ,M.M.; El-Zayat ,E.M. and
Hermersdofer ,H. (2000).Insecticidal
activity mammalian cytotoxicity and
mutagenicity of ethanolic extract from
Nerium oleander (Apocynaceae). Ann
.Appl .Biol.Vol:136:153-1157.
- French,N.P.,Wall, R. and Cripps ,P.J.(1992).
The prevalence of blowfly strike in
England and Walse.J.Vet Rec.131 :337.
- French, N. p., Parkin, T. D. and Morgan, K.
L. (1996). A case control study of blow
fly strike in lambs. Vet. Rec. J., 19: 384 –
388.
- Granz ,W.,Schneider ,D. and Schumann
,H.(1975). Human Myiasis in middle
Europe . J.Gesamte Inn.Med , 30 :293 –
301 .
- شعبان، عوَّاد و الملاح، نزار مصطفى (1993)
المبيدات. مطبعة جامعة الموصل، 520 صفحة.
عبد الفتَّاح، نهاد مصطفى (1989). تأثير درجات الحرارة
الثابتة و المتبادلة و الرطوبة النسبية في نمو و بقاء
و تكاثر الذبابة المنزلية
Musca domestica. رسالة ماجستير – كلية
العلوم – جامعة بغداد.
العيداني، أسماء عبد الزهرة سبع (2006). دراسة تأثير
المستخلصات النباتية لأوراق نبات الحناء
Lawsonia inermis L. و قشور الجفت
Quercus infectoria Oliv. في الأداء الحياتي
للذبابة الزرقاء *Lucilia sericata* (Meigen)
(Calliphoridae :Diptera)، رسالة ماجستير –
كلية التربية – جامعة البصرة، 138 صفحة.
الفرحاني، إيمان موسى فرحان (2001). التأثير السمي
لبعض المستخلصات النباتية في الأداء الحياتي
لحشرة الذبابة المنزلية *Musca domestica*
(Diptera: Muscidae)، رسالة ماجستير – كلية
الزراعة – جامعة البصرة، 107 صفحة.
منصور، سميح عبد القادر (1982). جريمة العصر. مجلة
البيئة و التنمية، مجلد 2، عدد (291):87.
المنصور ، ناصر عبد علي (1995). تأثير مستخلصات
مختلفة من نبات قرن الغزال *Ibicella lutea* في
الأداء الحياتي للذبابة البيضاء *Bemisia tabaci* ،
أطروحة دكتوراه. قسم وقاية النبات، كلية الزراعة،
جامعة بغداد.
المنصور ، ناصر عبد علي؛ الهدلك، كاظم صالح و
الحلفي، مشتاق عبد المهدي (2004). فعالية
الزيوت الطيارة لنبات القرنفل في حياتية الذباب
المنزلي *Musca domestica* (Muscidae: Diptera)
مجلة البصرة للعلوم. 22 (1): 139 –
147 .
نجم، شروق عبد الله (2006). تأثير المستخلصات النباتية
لنبات التبغ *Nicotina tabacum* و الخروع
Ricinus communis و الشنان *Haloxylon*
sp في بعض جوانب الأداء الحياتي لذبابة
التدويد *Calliphora vicina* (Rob Desvoidy, Calliphoridae: Diptera)
(1830)، رسالة

- Ladd, T. L., Jacobson, M. and Buriff, C. R. (1978). Japanese Beets: Extracts from neem tree seeds as feeding deterrents. J. Econ. Entomol., 7: 810 – 813.
- Raju, M. , Thakur, S. S. and Maruthi, R. G. (1990). Sterilizing activity of the flower extract of *Thervitia neriifolia* on the male fifth instar nymph of red cotton bug *Dysdercus similes* F. (Heteroptera: Pyrrhocoridae). J. Anim. Morphol. Physiol., 37: 77 – 78.
- Schoonhoven, L. M. (1982). Biological aspects of antifeedants. Entomol. Exp. Appl., 31: 57 – 69.
- Sukontason, K. L., Boonchu, N., Sukontason, K. & Choochote, W. (2004). Effect of eucalyptol on house fly (Diptera : Muscidae). J. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo. 46 (2) : 1-8 .
- Tyler, V. E. , Brady, L. R. and Robberts , J. E. (1988). Pharmacognosy. Lea and Fibiger, Philadelphia, 9th ed .
- Wyalt, G. R. and Davey, K. G. (1996). Cellular and Molecular action of juvenile hormone, 2. Roles of juvenile hormone in adult insects. Adv. Ins. Physiol., 26: 1 – 155.
- Zumpt, F. (1965). Myiasis in man and animals in the old world. A textbook for Physicians, Veteranians and Zoologists. Butterworth Co., London.
- Goodwin, T. W. and Mercer, E. I. (1985). Introduction to plant Biochemistry. Pergamon Press. UK. 2nd ed., 677.
- Gilbert, L.I. , Rybczynski , R. and Tobe , S.S.(1996). Endocrine cascade in insect metamorphosis , Acadimic Press, New York : 59-107 .
- Halify, N. A. and Al-Zubaidy, F. (1989). The effect of difference host plants on biology of Lemon butterfly *Papilio demoleus*. Proe. 5th Sci. Cont. Res. Coun. 16: 57 – 68.
- Hall ,M.J.R. (2001) .Introduction to Entomology .The Natural History Museum , London ,UK : 334 .
- Harborne, J. B. (1984). Phytochemical methods, Chapman and Hall, New York, 288 pp.
- Huchinson, R. (1998). Myiasis and control , available at : <http://WWW.roberth.u.net.com/myiasis.htm>.
- Kacmar, P., Pistl, J. and Mikula, I. (1999). Immunotoxicology and Veterinary medicine. Acta. Vet. Brno., 68: 57 – 79.
- Klock, J. A. and Chan, B. G. (1982). Effect of cotton condensed tannin on feeding and digestion in the cotton pest *Heliothis zea*. J. Ins. Physiol., 28: 911 – 915.
- Knotec ,Z. Fischer, O.A. and Jaki ,V. (2005) .Fatal Myiasis caused by *Calliphora vicina* in Hermans tortoise (Testudo Hermanni) .Acta.J.Vet.Brno.74:123-128.

Effect of alcoholic extract of *Cuscuta campestris* yunker (Cuscutaceae) on the larval and pupal Instars of *Calliphora vicina* Rob.Desvoidy (1830) (Calliphoridae: Diptera)

**A.A.Z.S. Al-Edany and A.A. Yaseen
College of Education – University of Basrah**

Summary

The alcohol extract of *Cuscuta campestris* was prepared and its biological effect was studied on the larval star and pupal star of *Calliphora vicina*.

The results showed that the 1st larval instar was the most sensitive, while the 3rd larval instar was the most resistance to the extract, and the highest mortality rates of the larval instars reach to 90% , 60% and 53.33% for the 1st, 2nd and 3rd instar on the concentration 75%.

The results also showed the effect of the pupal stage on alcoholic extract, which caused morality of pupa and reducing weight so gives abnormal and short adults with abnormal wings, while the highest mortality rate of the pupa reached 60 % on the concentration 75% and the lower pupal weight reached 0.116 gm/ 30 pupa on the same concentration compared with the control which them weight reached to 0.65 gm, and highest abnormality rate of adults reached 33.33 % and highest mortality rates of adults reached 40% on the same concentration.
