

PRAKTYKA LABORATORYJNA

JANUSZ WIERCIŃSKI, JANUSZ MATUSIEWICZ

Wykorzystanie skaningowego mikroskopu elektronowego w analizie elementarnej materiału biologicznego

Centralne Laboratorium Aparaturowe AR,
ul. Akademicka 13, 20-034 Lublin

Obraz w transmisyjnym mikroskopie elektronowym (TEM) — jak powszechnie wiadomo — powstaje dzięki różnicy absorpcji wiązki elektronowej w poszczególnych elementach oglądanego ultracienkiego preparatu. W mikroskopie elektronowym skaningowym (SEM), wielokrotnie zwężona wiązka elektronowa poddawana jest działaniu pola magnetycznego, które powoduje odchylenie strumienia elektronów zarówno wzdłuż osi x , jak i y , w wyniku czego wiązka ta analizuje kolejno liniowo powierzchnię badanego preparatu (grubość nie odgrywa tu większej roli). Zderzeniom elektronów o określonej energii z poszczególnymi fragmentami powierzchni preparatu towarzyszy szereg zjawisk fizycznych, takich jak:

- odbicie, absorpcja lub transmisja elektronów bombardujących,
- emisja elektronów wtórnych,
- emisja elektronów Augera,
- fluorescencja składników próbki.

Każde z tych zjawisk może być wyzyskane do badania preparatu. Najczęściej wykorzystuje się elektrony odbite (wiązki pierwotnej), dające najwięcej informacji o topografii (rzeźbie) powierzchni próby. Elektrony te po odbiciu od zewnętrznych warstw preparatu są zbierane przez kolektor i — po odpowiednim wzmocnieniu — skierowane na siatkę sterującą lampy monitora. Tam utworzony z nich obraz może być obserwowany i rejestrowany. Sygnał uzyskany z tych elektronów pozwala śledzić nie tylko topografię powierzchni, ale także ustalać orientację kryształitów próbki lub różnicę w składzie chemicznym preparatu (15).

Największą jednak korzyścią, osiąganą w SEM, jest otrzymanie obrazu powierzchni preparatu, charakteryzującego się wysoką głębią ostrości, przy zachowaniu dużej zdolności rozdzielczej rzędu 5 nm.

Bombardowanie badanego obiektu skupioną wiązką elektronów wyrzucanych z działka mikroskopu — jest także powodem innego jeszcze zjawiska, a mianowicie emisji promieni Roentgena — przez tak pobudzane atomy pierwiastków preparatu. Spektrum tego promieniowania zależy od rodzaju i ilości chemicznych składników próby. W ten sposób skaningowy mikroskop elektronowy, jeżeli zostanie wyposażony w dodatkowe urządzenia do analizowania promieni X , może służyć nie tylko do ba-

dania struktury powierzchni mikroobъекtów biologicznych, lecz także do określania składu chemicznego tych jego obszarów, jakie są przedmiotem obrazu.

Aczkolwiek wytwarzanie promieni X ma miejsce we wszystkich typach mikroskopów elektronowych, dopiero jednak mikroskop skaningowy daje możliwość wygodnego i wszechstronnego wykorzystania ich do mikroanalizy, z uwagi na stosowaną w nim znacznie zwężoną wiązkę elektronów oraz łatwość w operowaniu preparatem.

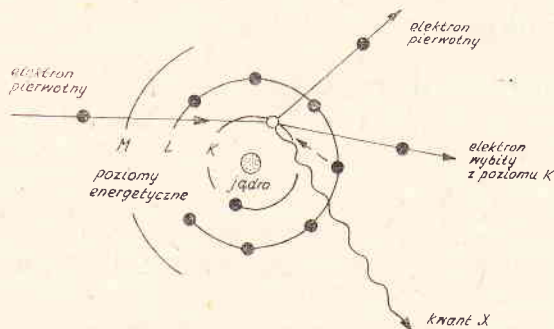
Spektrometria rentgenowska w mikroobszarach, bo takim terminem została określona metoda wykorzystująca promienie X do mikroanalizy chemicznej, zajmuje obecnie czołowe miejsce wśród nowoczesnych metod określania niejednorodności ciał stałych. Pozwala ona na przeprowadzenie jakościowej i ilościowej analizy chemicznej materiałów w wybranych obszarach o średnicy rzędu 1 μm . Twórcą tej metody jest Casting, który w 1951 r. opublikował we Francji pierwsze dane dotyczące budowy prototypu mikroanalizatora rentgenowskiego (2).

Rentgenowskie widmo emisyjne od dawna stanowi podstawę do oznaczania składu chemicznego różnorodnych materiałów. Wykorzystanie go jednak do analiz w mikroobszarach, jak to ma miejsce w mikroanalizatorach rentgenowskich (lub SEM wyposażonych w odpowiednie spektrometry) stało się możliwe dopiero z chwilą rozwiązania problemu ogniskowania wiązki elektronów na obszarach o średnicy rzędu mikrometra i detekcji pojawiającego się promieniowania X o stosunkowo słabym natężeniu. Pierwszy problem został pokonany dzięki osiągnięciom w budowie mikroskopów elektronowych, rozwiązanie drugiego zawdzięcza się rozwojowi fizyki jądrowej.

Zasada metody

Kiedy wyrzucone z dużą energią elektrony działka mikroskopu (elektrony pierwotne) uderzają o powierzchnię próby, część z nich powoduje wybicie elektronów z orbit napotykanym tam różnym atomów. Powrót tak wzbudzonych atomów do stanu podstawowego wiąże się z przesunięciem elektronów z wyżej położonych powłok do wewnętrznych, skąd nastąpiło wybicie, a nadwyżka energii powyższego przesunięcia jest emitowana w postaci promieni X .

Przebieg tego zjawiska został schematycznie pokazany na ryc. 1. Energia emitowanych promieni X (długość ich fal) jest zależna od rodzaju atomu, tzn. drogi (różnicy energii) przesunięcia elektronu — stąd charakterystyczna dla każdego pierwiastka.



Ryc. 1. Schematyczny przebieg emisji kwantu X w atomie bombardowanym strumieniem elektronów

W zależności od tego z którego podpoziomu energetycznego L_{II} czy L_{III} elektron zapełnia lukę w poziomie K, linie widmowe oznakuje się $K\alpha_2$, $K\alpha_1$. Linie serii K mają największe prawdopodobieństwo przejść i ich natężenie jest największe. Seria widmowa K pierwiastków jest zawsze najprostszą (zawiera najmniej linii w widmie), gdyż ten poziom energetyczny nie rozpada się na podpoziomy. Seria L (uwarunkowana przejściami elektronów z wyższych podpoziomów energetycznych na poziom energetyczny powłoki L) jest już bardziej skomplikowana. Z tego samego powodu jeszcze bardziej bogate w linie będą serie M. Ze zwiększeniem ilości linii widmowych wzrasta możliwość ich nakładania się na siebie. Z tego względu do celów analitycznych wykorzystuje się głównie widmo serii K lub serii L. Wzbudzenie odpowiedniej serii zależy od wielkości potencjału zastosowanego do wytworzenia bombardującej wiązki elektronów (energii wiązki). Długości fal emitowanej serii widmowej są uwarunkowane określoną różnicą poziomów energetycznych, które są charakterystyczne dla atomów każdego pierwiastka. Ze zwiększeniem liczby atomowej pierwiastka większe są różnice energii między wewnętrznymi poziomami energetycznymi, a w konsekwencji emitowane promieniowanie rentgenowskie jest bardziej krótkofalowe.

Spektrum promieni X uzyskiwane z jakiegoś pierwiastka zawiera szereg charakterystycznych pików, z których każdy odpowiada energii przeniesienia elektronu w atomie. Ponieważ elektrony powłok wewnętrznych nie biorą udziału w wiązaniach chemicznych, dlatego ich energia nie zależy od wiązania atomu w cząsteczce. Stąd promieniowanie rentgenowskie, otrzymane w wyniku przeskoku elektronów między powłokami położonymi blisko jąder, nie zależy od budowy cząsteczki (budowy związku w skład którego wchodzi atom), ani też od stanu fizycznego bombardowanego elektronami materiału. Promieniowanie to jest charakterystyczne dla atomów poszczególnych pierwiastków z których zbudowany jest preparat.

W skaningowym mikroskopie elektronowym detekcji promieni X i rejestracji ich spektrum dokonuje się w specjalnych przystawkach, nie należących zwykle do standardowego wyposażenia i składających się ze spektrometru rentgenowskiego połączonego z urządzeniem rejestrującym.

Technika pomiaru

Spektrometry stosowane w SEM nie odbiegają w zasadzie budową od tych, jakie są używane powszechnie do wykrywania i badania promieniowania rentgenowskiego o słabym natężeniu. Zadaniem spektrometru jest wydzielenie z charakterystycznego pro-

mieniowania X — wzbudzonego w analizowanej próbce — poszczególnych składowych monochromatycznych (fal o tej samej długości) lub poziomów energetycznych oraz ich detekcja, wzmocnienie i rejestracja. Uzyskany zapis jest podstawą do określenia rodzaju i stężenia pierwiastków występujących w bombardowanym obszarze próby. Produkowane obecnie seryjnie układy detekcyjno-analizujące spektrometrów umożliwiają wykrycie i oznaczenie pierwiastków w zakresie liczb atomowych 5–92, a więc od boru do uranu (16). Analizę wzbudzonego promieniowania przeprowadza się przy pomocy spektrometru dyspersji długości fali (WDS) lub spektrometru dyspersji energii (EDS).

Technika analizy rozkładu pierwiastków przy zastosowaniu spektrometru dyspersji długości fali wymaga wydzielenia poszczególnych fal z emitowanej wiązki X, co osiąga się za pomocą kryształów monochromatorów. Jeżeli padająca na kryształ wiązkę promieni X zawiera kilka długości fali, to ich odbicie od płaszczyzny kryształu zachodzi pod różnymi kątami θ , co zostało ujęte przez Bragg'a w postaci wzoru:

$$n\lambda = 2d_{hkl} \cdot \sin \theta$$

gdzie:

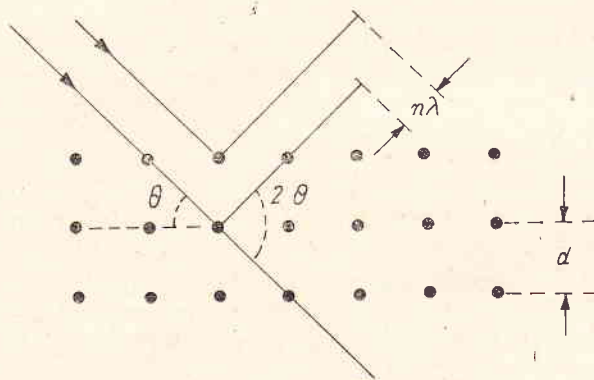
n — liczba całkowita, rząd widma

λ — długość fali promieniowania w nm

d_{hkl} — odległość między płaszczyznami sieciowymi hkl w kryształach w nm (stała dla każdego kryształu)

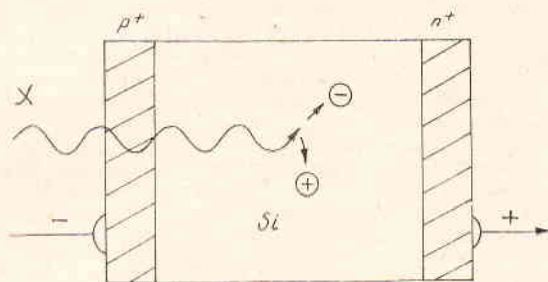
θ — kąt odbłyску, tzn. kąt zawarty między wiązką promieniowania padającego a płaszczyzną odbicia.

W takim kryształach zachodzi zjawisko dyfrakcji promieni X, które w sposób schematyczny zilustrowano na ryc. 2. Obracając kryształ spektrometru w zakresie kątów $0-90^\circ$ uzyskuje się możliwość selektywnego odbijania fal o różnej długości zawartych w emitowanej wiązce promieniowania, stąd do rozdzielania promieniowania charakterystycznego różnych pierwiastków. W zależności od typu aparatury rejestruje się bądź kąt odbicia θ , bądź też skalę kątową jest bezpośrednio wycechowana w długościach fal.



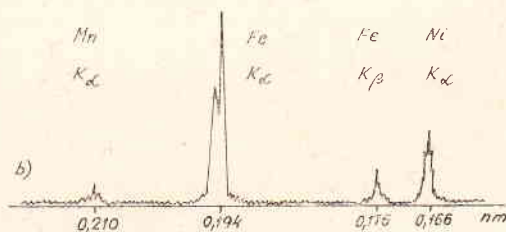
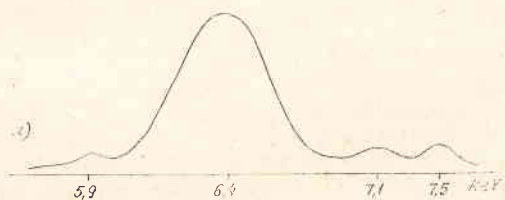
Ryc. 2. Dyfrakcja promieni X w kryształach monochromatorów WDS (punktami oznaczono atomy w sieci krystalicznej)

Natomiast analiza składu chemicznego preparatu przy użyciu spektrometru dyspersji energii przebiega bez kryształu monochromatora, lecz przy pomocy fotodiody krzemowej typu p-i-n z grubym obszarem obojętnym (warstwa „i”) słabo domieszkowanym litem (8). Diody umieszcza się możliwie najbliżej źródła promieniowania (preparatu). Kwant X, przechodząc przez obszar obojętny, powoduje generację par elektron — dziura (ryc. 3). Przez zebranie wszystkich



Ryc. 3. Schemat budowy fotodiody p-i-n spektrometru dyspersji energii

par, dzięki przyłożonemu polu elektrycznemu, otrzymujemy pewien impuls prądowy. Znając energię potrzebną do wytworzenia jednej pary w danym złączu i wiedząc, że wielkość impulsu jest wprost proporcjonalna do ilości wytworzonych par, można określić energię kwantu X. Sygnał prądowy jest następnie wzmacniany przez tranzystor polowy chłodzony ciekłym azotem oraz przez wzmacniacz liniowy, a po uformowaniu skierowany do wielokanałowego analizatora amplitudy (wysokość impulsu) i wyświetlany jako widmo energetyczne. (ryc. 4).



Ryc. 4. Porównanie spektrum uzyskanych w SEM dla tego samego preparatu przy pomocy: a) spektrometru dyspersji energii; b) spektrometru dyspersji długości fali

Analizy przy pomocy spektrometru EDS charakteryzują się wysoką czułością i szybkością pomiaru (tab. 1). Pomiar z wykorzystaniem spektrometru WDS posiada lepszą rozdzielczość (ułatwienie, które może być istotne, kiedy interferują spektra wielu składników) oraz może objąć większą liczbę pierwiastków.

W praktyce korzysta się z sygnałów obu spektrometrów, przy czym nowoczesne mikroskopy pozwalają na korzystanie z nich w tym samym czasie (17).

Analiza jakościowa

Kiedy promienie X są emitowane i wykrywane, w spektrometrze mikroskopu uzyskuje się spektrum, które musi być następnie przeanalizowane. Otrzymane spektrum jest rozłożone na rozległym widmie ciągłym, tzw. tle, wywołanym przez rozproszenie elektronów wiązki pierwotnej przez atomy próby. Chociaż pozycja pików w uzyskanym spektrum jest charakte-

rystyczna dla poszczególnych pierwiastków (identyfikuje pierwiastek jakościowo) konieczna jest tam systematyczna identyfikacja i określenie każdego pików, ponieważ jeden pierwiastek może produkować wiele pików.

Podstawą analizy jakościowej jest zależność między długością fal charakterystycznego promieniowania rentgenowskiego (poziomą jego energią) emitowanego przez próbkę a rodzajem występujących w niej pierwiastków. Technika wykonania analizy jakościowej sprowadza się więc do określenia długości fal (λ) lub rozkładu energetycznego charakterystycznego promieniowania X wysyłanego przez próbkę i porównania ich do odpowiednich widm uzyskanych dla wzorców poszukiwanych pierwiastków. To zadanie wykonuje zwykle komputer SEM.

Tab. 1. Charakterystyka spektrometrów SEM: dyspersji energii (EDS) i dyspersji długości fal (WDS)

Dane pomiarowe	Spektrometr	
	EDS	WDS
Zdolność rozdzielcza w 6,4 keV	Dostateczna (ok. 150 eV)	Bardzo dobra (ok. 10 eV)
Wydajność zliczeń	Wysoka	Niska
Prowadzenie pomiaru	Jednocześnie dla wszystkich energii	Kolejno dla poszczególnych długości fal
Oznaczane pierwiastki	L. atom. 10—92 *)	L. atom. 4—92
Dolna granica wykrywalności	10 ⁻¹⁶ —10 ⁻¹⁷ g	10 ⁻¹⁵ —10 ⁻¹⁶ g
Dokładność i precyzja	ok. 5% wzgl.	ok. 5% wzgl.
Typowy stosunek wartości pików do tła	20—100	200—2000

Objaśnienie: *) bezokienkowe detektory EDS dają możliwość oznaczania C, N lub O.

W praktyce analitycznej stosuje się zasadniczo dwa sposoby jakościowego określenia składu chemicznego próbki: rejestrację „pełnego widma” pierwiastków próbki lub też technikę „celowania”. Rejestracja „pełnego widma” polega na zapisie przy pomocy rejestratora wszystkich linii emisyjnych uzyskanych przez odbicie od kryształów monochromatorów (lub poziomów energetycznych), pokrywających cały zakres analityczny pierwiastków od boru do uranu. Sposób ten stosuje się na ogół przy braku jakichkolwiek danych o próbce. Technika „celowania” polega natomiast na ustawieniu spektrometru na z góry przewidywany kąt Θ (poziom energetyczny), co odpowiada celowaniu na odpowiedni pierwiastek. Analizę jakościową można przeprowadzić wzdłuż wybranej linii prostej lub na całej powierzchni próby.

Analiza ilościowa

Podstawą analizy ilościowej jest proporcjonalna zależność między natężeniem emitowanego promieniowania pierwiastka a koncentracją tego pierwiastka w próbce. Przyjmując, że I_A i $I_{(A)}$ oznaczają odpowiednio natężenie emitowanego promieniowania charakterystycznego pierwiastka A w próbce i w czystym spektralnie wzorcu, można wyznaczyć stężenie pierwiastka C_A z równania:

$$C_A = \frac{I_A}{I_{(A)}}$$

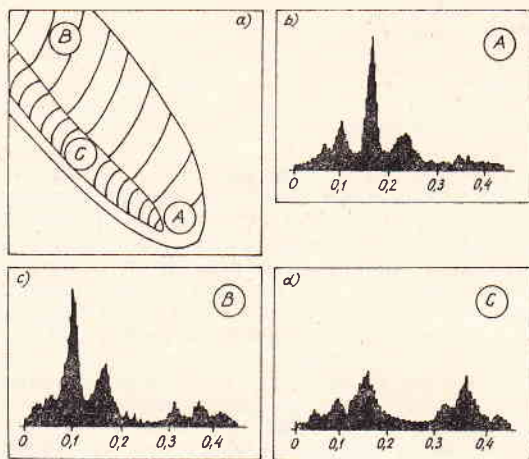
Zależność ta jest jednak słuszna tylko dla próbek, których składnikami są pierwiastki o bliskich liczbach atomowych. W przypadku próbek, których składniki różnią się znacznie liczbą atomową równość ta nie jest spełniana i oznaczenia stężenia pier-

wiastków w próbce wymagają odpowiednich poprawek. Różnice są wynikiem tego, iż natężenie promieniowania emitowanego ulega osłabieniu zanim dojdzie do spektrometru i zostanie zarejestrowane. Jest ono wywołane przez absorpcję promieniowania X w próbce przez atomy pierwiastków będących w przewadze ilościowej oraz wygaszanie promieniowania charakterystycznego jednego pierwiastka na korzyść wzbudzenia fluorescencyjnego innych (tzw. efekty matrycowe).

Analiza ilościowa przy pomocy spektrometru dyspersji energii umożliwia bardzo szybkie oznaczenie większości pierwiastków występujących w próbce. Jednakże, gdy pierwiastki występują w stężeniach śladowych wyzwanych jest mniej promieni X i wymagany jest dłuższy czas ekspozycji, ponieważ detektor spektrometru (EDS) posiada określony próg zliczania.

Przewaga analizy ilościowej przy zastosowaniu spektrometru dyspersji długości fali polega na tym, że możliwe jest oznaczenie pierwiastków o niższej liczbie atomowej (L. atom. 5–10), jak również i pierwiastków śladowych w matrycy cięższych pierwiastków. Z powodzeniem można przeprowadzić także określenie tych pierwiastków, których energie promieni X leżą bardzo blisko siebie, np. Ba i Ti lub Pb i S, i są bardzo trudne lub niemożliwe do oznaczenia spektrometrem dyspersji energii.

Oba rodzaje omawianych analiz przeprowadza się przez określenie sygnału netto intensywności promieni X, tzn. pik minus tło i porównanie z intensywnością uzyskaną dla czystych standardów pierwiastków lub standardów pierwiastka znajdującego się w matrycy składników o składzie podobnym do próby.



Ryc. 5. a) szkic elektronogramu SEM fragmentu algi. A, B, C miejsca analizy punktowej; b), c), d) różnice w składzie pierwiastkowym w punktach A, B i C

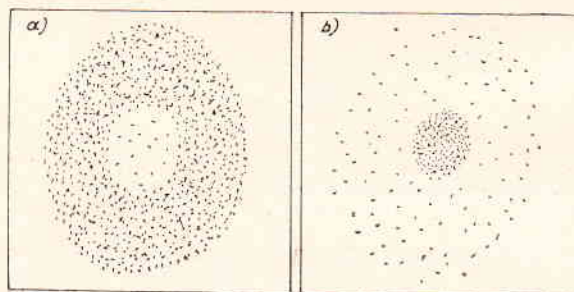
Ilościową analizę elementarną w oglądanym obiekcie można przeprowadzić 4 sposobami (7), jako: analizę punktową, powierzchniową, wzdłuż wytyczonej linii i jako rozkład pierwiastkowy.

Analizę punktową stosuje się do analizowania (identyfikacji) małych szczegółów i porównania składu różnych regionów próby (ryc. 5). Analiza powierzchniowa jest podobna do punktowej z tym, że wiązka elektronowa omiata się coraz to nowe punkty i porównuje różnice wywołane niejednorodnością w rozkładzie pierwiastkowym. Wzdłuż linii podstawowej bada się rozkład wybranych pierwiastków, jak to pokazuje ryc. 6. Pierwiastkowy rozkład daje za każdym razem rozkład wybranego pierwiastka na badanej powierzchni (ryc. 7).

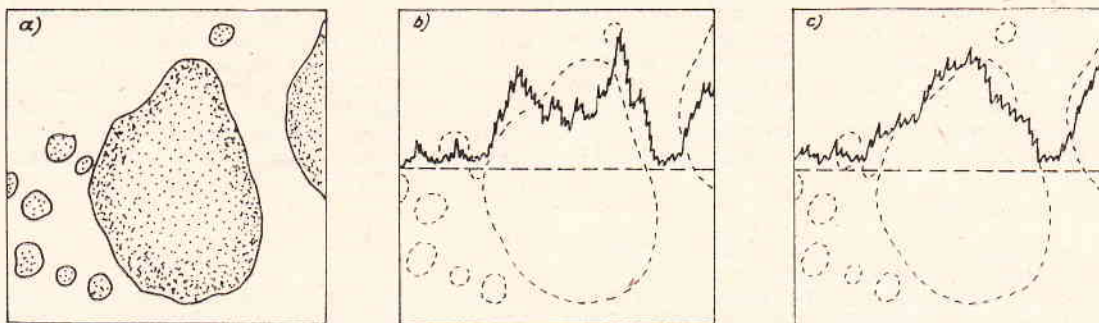
Przygotowanie preparatów

Przygotowanie preparatów obiektów biologicznych do mikroanalizy przy pomocy SEM jest identyczne jak do badań jedynie topografii ich powierzchni. Obejmuje następujące etapy:

- utrwalenie próby — najczęściej w buforowanym izotonicznym roztworze aldehydu glutarowego, mające na celu zapobieganie zmianom ultrastruktury.
 - odwodnienie — w roztworze o wzrastającym stężeniu alkoholu etylowego lub acetonu, względnie na drodze liofilizacji. Wybór metody zależy od rodzaju tkanki.
 - napylenie wysuszonego preparatu atomami złota lub innego dobrego przewodnika prądu w celu ochrony próby przed przegrzaniem i gromadzeniem się ładunku elektrostatycznego. Bez tego zabiegu może dochodzić w trakcie analizy do niekontrolowanego odchyłania się wiązki pierwotnej.
- Jeżeli mikroanalizę przeprowadza się przy pomocy skaningowego mikroskopu transmisyjnego, przygotowanie prób obejmuje jeszcze jedną czynność, a mianowicie pokrojenie preparatu na ultracienkie skrawki z wykorzystaniem ultramikrotomu.



Ryc. 7. Rozmieszczenie pierwiastków w czerwonej krwince płaza (amphiuma): a) rozmieszczenie siarki; b) rozmieszczenie fosforu



Ryc. 6 a) szkic elektronogramu fragmentu tkanki nerkowej szczura (pow. 10 000×); b) rozkład wapnia wzdłuż naszkicowanej linii; c) rozkład fosforu wzdłuż naszkicowanej linii

Zastosowanie

W ostatnich 20 latach powiązanie SEM ze spektrometrem promieni X daje nieocenione usługi w wielu dziedzinach badawczych (9, 11, 12, 13, 15). Jest ono najbardziej wszechstronnym narzędziem zarówno dla rutynowych, jak i naukowych badań obejmujących niedestruktywną analizę ciała stałego. Opisaną metodą można przeprowadzać analizę elementarną dowolnego materiału biologicznego. Jak już wcześniej wspomniano istnieje możliwość oznaczania wszystkich pierwiastków w zakresie liczb atomowych od 5—92. Ograniczenia dotyczą wykrywania i oznaczania tylko tych pierwiastków, których stężenie leży poniżej czułości metody. Czułość ta, wyższa dla pierwiastków cięższych, leży w granicach 0,001—0,1%. Precyzja metody waha się w przedziale 1—5% (8). Niezmiernie efektywnie, ze względu na mikroobjętość analizowanego materiału, przedstawia się bezwzględna granica wykrywalności pierwiastków, określona na około 10^{-17} g. (7).

Liczne są przypadki zastosowań elementarnej mikroanalizy rentgenowskiej z wykorzystaniem SEM do określania składników materiału biologicznego. Najczęściej dotyczą one mikroobjektów. Przykładem tego jest oznaczanie Na, K, Ca, Mg, P, Cl, Si, S i Fe w pojedynczych komórkach tkanek zwierzęcych (1, 4), wszystkich możliwych do oznaczeń pierwiastków (w tym C i N) w komórkach bakterii i grzybów (10, 16, 17), pierwiastków mineralnych w plemnikach (5, 6), Na, K, Ca, Mg, P, Si, Fe, Zn, Co

i Mn w ściankach aorty (18), Ca w zakończeniach komórek nerwowych (14), itp.

Dzięki swym zaletom rentgenowska analiza spektralna w mikroobszarach staje się coraz bardziej powszechnym narzędziem analitycznym, a także jest udoskonalana. Techniki analityczne rozwijane w ostatnich latach z zastosowaniem transmisyjnego skaningowego mikroskopu elektronowego (STEM) oraz przystosowane do płynów ustrojowych stwarzają dodatkowe możliwości oznaczania elementarnych składników chemicznych w dowolnym miejscu obiektu biologicznego (3, 11, 12).

Piśmiennictwo

1. Bayonove J.: Biol. Cell 31, 303, 1978.
2. Bojarski Z.: Mikroanalizator rentgenowski. Metoda analizy chemicznej w mikroobszarach. Katowice 1971.
3. Dong P., Lonsdale D., Flewitt P. E. J.: JEOL News 18E, 2, 1980.
4. Dykes S. G., Cameron J. L., Smith N. K. R.: J. Cell. Physiol. 100, 305, 1979.
5. Pain-Maurel M. A., Dadoune J. P.: Arch. Androl. 3, 1, 1979.
6. Gould K. G., Graham C. E.: Scanning Electron Microsc. 2, 603, 1978.
7. Heywood J. A.: Intern. Lab. 9, 45, 1979.
8. JEOL — Analytical TEMSCAN: JEOL News 15E, 25, 1977.
9. Kimoto S.: JEOL News 10E, 2, 1972.
10. Lawrey J.: Mycologia 69, 855, 1977.
11. Nanae T., Yotsumoto H.: JEOL News 10E, 24, 1972.
12. Quinton P. M.: Am. J. Physiol. 234, F 255, 1978.
13. Shibuya M.: JEOL News 10E, 36, 1972.
14. Silbergeld E. K., Costa J. L.: Exp. Neurol. 63, 277, 1979.
15. Smith H., Flanders D. C., Shaver D. C.: Scanning Electron Microsc. 1, 33, 1978.
16. Thibaut M., Ansel M., De Azevedo Carneiro K.: Am. J. Pathol. 90, 23, 1978.
17. Yakowitz H.: X-Ray microanalysis in scanning electron microscopy. Proceeding of 7th Annual SEM Symposium, Chicago 1974.
18. Zechmeister A., Matono P.: Folia Morphol. 25, 353, 1977.

Adres autora: doc. dr habil. Janusz Wierciński, ul. Sołwińskiego 8/31, 20-040 Lublin.

Z HISTORII WETERYNARII

SEFAN JAKUBOWSKI
Opole

Lekarze weterynarii jako nauczyciele akademickich szkół rolniczych w latach 1820—1939

Wiadomości dotyczące wykładów z zakresu weterynarii w szkołach rolniczych zostały ostatnio wzbogacone o nowe materiały. Niniejsze opracowanie obejmuje cały okres wraz z okresem międzywojennym.

Marymont

Pierwsza wyższa szkoła rolnicza w Marymoncie pod Warszawą powstała w 1816 r., a oficjalnie jej otwarcie nastąpiło 1820 r. pod nazwą Instytut Agromiczny w Marymoncie, przemianowany w 1840 r. na Instytut Gospodarstwa Wiejskiego i Leśnictwa. Instytut przetrwał do 1862 r., ale w latach 1831—1836 został przejściowo zamknięty przez władze carskie z powodu niepodległościowej, konspiracyjnej działalności młodzieży akademickiej. Studia w Instytucie trwały początkowo dwa, a później trzy lata i po ich ukończeniu wydawano, zależnie od wyników egzaminów, dyplomy agronomów I lub II klasy. Program nauczania weterynarii obejmował krótki rys anatomii i fizjologii zwierząt, naukę o częściej występujących chorobach, sposoby profilaktyki i udzielanie pierwszej pomocy w nagłych wypadkach oraz naukę kucia koni.

Przedmiot weterynarię w marymonckim Instytucie wykładali: w latach 1822—1824 oraz w latach 1836—1840 lekarz weterynaryjny I klasy Fryderyk Jacob (około 1800—1841), Saksończyk w służbie polskiej, dyplom uzyskał w Dreźnie w 1822 r. i od 1822 r. był wykładowcą w Instytucie Weterynarii w Burakowie pod Warszawą, w latach 1824—1831 prof. dr med., dr med. wet. Antoni Rudnicki (1785—1838). Jako pierwszy Polak uzyskał doktorat medycyny weterynaryjnej w 1808 r. w Wiedniu. W latach 1824—1830 był dyrektorem Instytutu Weterynarii w Burakowie, następnie wykładał w Krakowie nauki weterynaryjne dla studentów medycyny i chirurgii. Zabiegał o utworzenie Wydziału Weterynarii przy Uniwersytecie Jagiellońskim, a także opracował projekt organizacyjny Szkoły Weterynaryjnej w Warszawie. Rudnicki był członkiem Królewskiego Towarzystwa Weterynaryjnego w Kopenhadze, ogłosił wiele prac naukowych. Na szczególną uwagę zasługuje „Historia rozwoju weterynarii od czasów starożytnych poprzez średniowiecze i czasy nowożytne”;

W latach 1840—1853 prof. mgr nauk weterynaryjnych Edmund Ostrowski (1816—1859), profesor Szkoły Weterynaryjnej w Charkowie, autor ustawy po-