

## مقاله علمی - پژوهشی

# یک زیست‌حسگر الکتروشیمیایی هوشمند مبتنی بر روش‌های یادگیری ماشین بهینه برای اندازه‌گیری آلودگی نیترات در آب

## کیوان آصف‌پور و کیلیان

استادیار، گروه مهندسی مکانیک بیوسیستم، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران  
تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۸/۱۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۳

### چکیده

در دو دهه گذشته، زیست‌حسگرهای آنزیمی فراوانی برای تشخیص اختصاصی و انتخابی نیترات معرفی شده‌اند. این زیست‌حسگرها عموماً از واکنش اکسایش-کاهش نیترات به نیتريت برای اندازه‌گیری نیترات بهره می‌گیرند. از آنجا که فعالیت آنزیم مورد استفاده در ساختار زیست‌حسگر با گذشت زمان کاهش می‌یابد، کاربرد زیست‌حسگر باید آنزیم تثبیت‌شده روی الکتروود کار را به طور مکرر جایگزین کند، که هزینه‌های تشخیص را افزایش می‌دهد و قابلیت تجاری‌سازی آن‌ها را محدود می‌کند. در این مطالعه، از شبکه‌های عصبی مصنوعی برای پیش‌بینی غلظت نیترات در نمونه‌ها با در نظر گرفتن داده‌های الکتروشیمیایی و کاهش فعالیت آنزیم در طول زمان استفاده شد. الگوریتم شاهین هریس به عنوان روش بهینه‌سازی فراابتکاری برای بهینه‌سازی پارامترهای وزن و بایاس شبکه‌های عصبی مصنوعی به‌کاررفته در واحد تصمیم‌گیری زیست‌حسگر استفاده شد. نتایج بررسی‌ها نشان داد که الگوریتم یادگیری بهینه‌شده منجر به پیش‌بینی امیدوارکننده غلظت نیترات در سطح میکرومولار با ضریب تبیین ۰/۹۵ شد. علاوه بر این، زیست‌حسگر معرفی شده توانایی استفاده تا ۳۰ روز پس از تثبیت آنزیم را دارد. مقایسه میان یافته‌های این مطالعه و مطالعات قبلی که از ماشین‌های بردار پشتیبان و سیستم‌های استنتاج فازی استفاده می‌کردند، نشان داد که شبکه‌های بهینه‌سازی شده با تکنیک‌های جدید فراابتکاری می‌توانند نتایج پیش‌بینی قابل‌اعتمادی تری ارائه دهند.

### واژه‌های کلیدی

آنزیم، الگوریتم شاهین هریس، داده‌های الکتروشیمیایی، هوش جمعیتی

### مقدمه

غلظت بالای نیترات در آب آشامیدنی به یک نگرانی قابل توجه برای انسان تبدیل شده است (Bendikov *et al.*, 2005). علاوه بر این، تعیین و کنترل غلظت نیترات در منابع آب زیرزمینی و سطحی برای حفظ کیفیت قابل قبول آب اولویت بالایی دارد. سازمان‌های بین‌المللی مانند سازمان جهانی بهداشت غلظت ۸۰۰ میکرومولار را به عنوان حد قابل قبول نیترات در آب آشامیدنی تعیین

کنترل، پایش و حذف آلاینده‌های زیست‌محیطی مانند نیترات در اکوسیستم‌های آبی و بافت‌های گیاهی برای کاهش اثرهای نامطلوب آن بر محیط‌زیست و سلامت انسان ضروری است (Alahi & Mukhopadhyay, 2018). کنترل و حذف مؤثر نیترات مستلزم تعیین دقیق غلظت آن در آب، خاک، گیاهان و دیگر نمونه‌های زیستی است.

تشخیص کم و حساسیت بالا، به‌جای روش‌های تشخیص مرسوم مورد توجه قرار گرفته است (Can *et al.*, 2012).

در واکنش اکسایش-کاهش کاتالیستی نیترات به نیتريت که در سامانه‌ای سه الکترودی اجرا می‌شود، پاسخ ولتامتری زیست‌حسگر توسط یک واحد پردازش سیگنال برای تعیین نیترات اندازه‌گیری و تحلیل می‌شود (Ahmad *et al.*, 2017). با توجه به اینکه فعالیت آنزیم به عنوان ماکرومولکول زیستی پس از تثبیت روی الکترود کار زیست‌حسگر به مرور زمان کاهش می‌یابد (Al Mamun *et al.*, 2021)، حذف و جایگزینی دوره‌ای آنزیم روی الکترود کار برای به دست آوردن نتایج اندازه‌گیری قابل اعتماد الزامی است. برای مثال، سیگنال الکتروشیمیایی یک زیست‌حسگر توسعه یافته برای تشخیص نیترات، حتی دو روز پس از آماده‌سازی الکترود، به دلیل فرآیند تخریب طبیعی نیترات‌ردوکتاز، بیش از ۱۰ درصد کاهش می‌یابد (Kalimuthu *et al.*, 2015). تثبیت آنزیم و آماده‌سازی الکترود معمولاً زمان‌بر است و هزینه‌ی اندازه‌گیری را افزایش می‌دهد. نیاز به تثبیت مکرر آنزیم به طور نامطلوبی بر تجاری‌سازی زیست‌حسگرهای زیستی توسعه یافته برای پایش محیط زیست تأثیر می‌گذارد (Al Mamun *et al.*, 2021).

برای حل این محدودیت، طول عمر الکترود کاری آماده شده به همراه داده‌های الکتروشیمیایی زیست‌حسگر را می‌توان برای به دست آوردن یک پیش‌بینی قابل اعتماد تجزیه و تحلیل کرد. در این شرایط، دستگاه هوشمند را می‌توان با استفاده از هوش مصنوعی به عنوان واحد تصمیم‌گیری توسعه داد (Cui *et al.*, 2020). اولین تلاش‌ها برای توسعه زیست‌حسگر هوشمند نیترات توسط آصف‌پور

کرده‌اند (Sohail & Adeloju, 2016). روش‌های تجزیه‌ای مختلفی مانند اسپکتروفتومتری (Yue *et al.*, 2004)، کروماتوگرافی (Chou *et al.*, 2003)، الکتروشیمیایی (Bui *et al.*, 2016)، الکتروفوریتیک (Gao *et al.*, 2004)، تزریق جریان (Legnerová *et al.*, 2002) و طیف‌سنجی فلورسانس (Huber *et al.*, 2001) برای تعیین نیترات استفاده شده‌اند. برخی الزام‌های محدودکننده، مانند محلول‌سازی و پیش‌تیمارهای ویژه نمونه، واکنش‌های کمکی برای تولید محصولی رنگی و مراحل جداسازی در کروماتوگرافی، قابلیت‌های تشخیص میدانی و فوری را در اکثر این روش‌ها کاهش می‌دهد (Alahi & Mukhopadhyay, 2018).

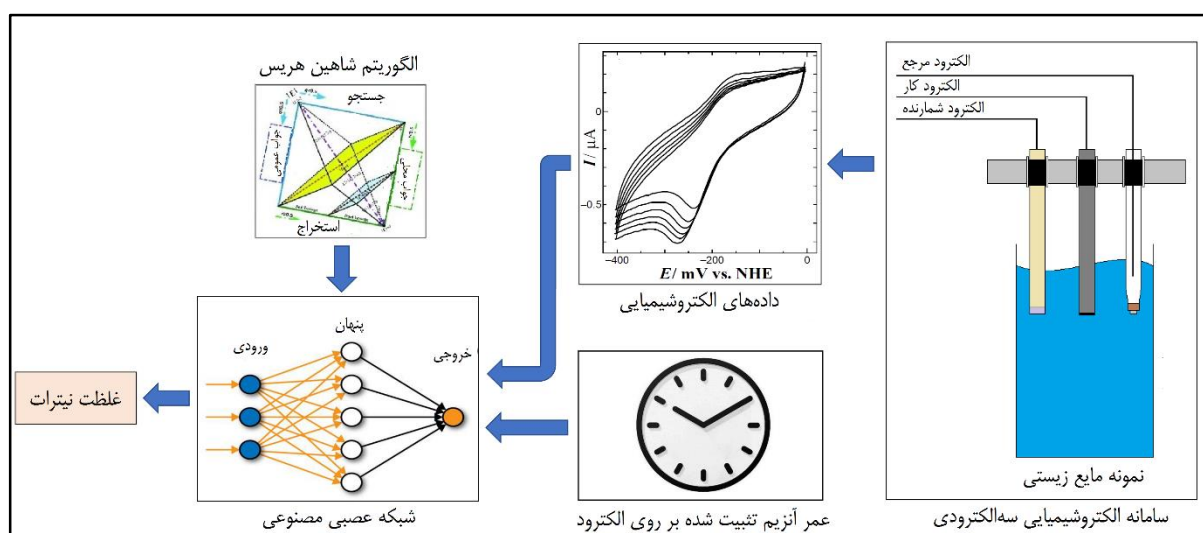
روش‌های قابل اطمینان برای تعیین نیترات برای واکنش الکتروشیمیایی نیترات در نمونه‌های مایع از کاتالیزور زیستی استفاده می‌کنند (Sohail & Adeloju, 2016). کاتالیزور زیستی، که می‌تواند آنزیم نیترات‌ردوکتاز یا موجودی زنده حاوی نیترات‌ردوکتاز باشد، برای کاهش کاتالیستی نیترات به نیتريت استفاده می‌شود. این کاتالیزور آنزیمی می‌تواند حساسیت الکترود و گزینش‌پذیری نسبت به کاهش نیترات را به طور قابل‌توجهی بهبود بخشد (Sohail & Adeloju, 2016). حسگرهای مختلفی که شامل الکترودهای انتخابی برای اندازه‌گیری غلظت نیترات هستند، با موفقیت معرفی شده‌اند تا نیترات را در طیفی وسیع از نمونه‌ها تعیین کنند. این حسگرها که شامل یک گیرنده زیستی برای هدف‌های تشخیص هستند، زیست‌حسگر نامیده می‌شوند (Turner, 2013). امروزه استفاده از زیست‌حسگرها برای تعیین غلظت کارآمد و قابل اعتماد به دلیل استحکام قابل توجه، سادگی ساختمان، گزینش‌پذیری بسیار بالا، حد

ویژگی‌های بهینه‌شده با الگوریتم‌های بهینه‌سازی کارآمد معرفی شده است تا اثرهای کاهش فعالیت آنزیمی پس از تثبیت آنزیم بر نتایج الکتروشیمیایی حسگر زیستی را لحاظ کند. به این منظور، یک زیست حسگر الکتروشیمیایی سه الکترودی برای ثبت داده‌های ولتامتری چرخه‌ای نمونه‌ها در نمونه‌های مایع زیستی به کار گرفته شد، در حالی که از یک واحد تصمیم‌گیری شبکه عصبی مصنوعی با وزن و بایاس بهینه شده توسط الگوریتم شاهین هریس برای تعیین نیترات بر اساس داده‌های الکتروشیمیایی بهره گرفته شد.

### مواد و روش‌ها

شکل ۱ شماتیک سامانه هوشمند پیشنهادی را نشان می‌دهد. این سامانه شامل دو بخش اصلی است، یکی برای استخراج پاسخ الکتروشیمیایی نمونه‌های تحت اندازه‌گیری و دیگری برای تصمیم‌گیری هوشمند.

وکیلان و مساح (Asefpour Vakilian & Massah, 2018a) صورت گرفت. متغیرهای ورودی این سامانه، داده‌های الکتروشیمیایی و طیف‌سنجی ثبت شده توسط زیست حسگر و همچنین خواص کارکردی الکتروود مانند دمای نگهداری، عمر آنزیم تثبیت شده بر الکتروود و pH نمونه بودند، در حالی که متغیر خروجی سامانه، غلظت نیترات بود. از روش‌های ساده یادگیری ماشین در این سامانه استفاده شده بود. در سال‌های اخیر، چندین حسگر زیستی هوشمند برای تعیین نیترات با استفاده از ماشین‌های بردار پشتیبان و سامانه استنتاج فازی توسعه داده شده‌اند (Asefpour Vakilian & Massah, 2018b; Massah & Asefpour Vakilian, 2019). به نظر می‌رسد با توسعه شبکه‌های عصبی مصنوعی با ساختمان بهینه‌شده به کمک الگوریتم‌های جدید فراابتکاری می‌توان به نتایج پیش‌بینی مطمئن‌تری برای زیست حسگرهای هوشمند دست یافت. در این تحقیق یک روش یادگیری ماشین نظارت‌شده با



شکل ۱- تصویر شماتیک زیست حسگر هوشمند نیترات

Fig. 1- The schematic image of the smart nitrate biosensor

## واحد سنجش الکتروشیمیایی نیترات

همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده است، یک واحد الکتروشیمیایی سه الکترودی حاوی یک الکتروود کار کربن شیشه‌ای، یک الکتروود شمارنده (کمکی) پلاتین و یک الکتروود مرجع نقره/نقره کلرید در نظر گرفته شد. جزئیات پیاده‌سازی زیست‌حسگر بر اساس تحقیق مسیح و آصف‌پور و کیلیان (Massah & Asefpour Vakilian, 2019) تعیین شد. به طور خلاصه، نیترات ردوکتاز ۳۰ میلی‌مولار با پایه/شریشیا کلی خریداری شده از شرکت سیگما<sup>۱</sup> در محلول بافر ۵۰ میلی‌مولار متشکل از بیس-تریس استات، کلرید پتاسیم، استات منیزیم و کلرید کلسیم روی الکتروود کار با پیپت چکانده شد تا الکتروود کار حاوی آنزیم آماده شود. از آنتراکوئینون-۲-سولفونات به عنوان واکنش‌گر واسطه به منظور انتقال الکترون میان آنزیم و الکتروود کار استفاده شد (Lambeck *et al.*, 2010). به منظور ارزیابی فعالیت آنزیمی پیش از اجرای آزمایش‌ها، از روش طیف‌سنجی در ناحیه ۵۹۵ نانومتر (Kim *et al.*, 2011) و بررسی ثابت میکائیلیس آنزیم بهره گرفته شد. ثابت میکائیلیس غلظتی از سوبسترا است که در آن سرعت واکنش برابر با نصف سرعت حداکثر واکنش است. با روشی که کالیموتو و همکاران (Kalimuthu *et al.*, 2013) ارائه داده‌اند، این ثابت برابر با ۱۰ میلی‌مولار به دست آمد که نشان‌دهنده فعالیت مناسب آنزیم خریداری شده بود.

برای ولتامتری چرخه‌ای از یک دستگاه پتانسیواستات تجاری<sup>۲</sup> به منظور جمع‌آوری پاسخ الکتروشیمیایی نمونه‌های تحت آزمایش استفاده شد. در سراسر اندازه‌گیری‌ها، پتانسیل الکتریکی به

الکتروود کار و الکتروود مرجع اعمال شد، در حالی که جریان الکتریکی بین الکتروودهای کار و پلاتین اندازه‌گیری و ثبت شد. محدوده روبش ولتامتری در بازه ۳۰۰- تا ۷۰۰- میلی‌ولت نسبت به الکتروود NHE با سرعت روبش ۵ میلی‌ولت بر ثانیه بود.

## واحد یادگیری ماشین

برنامه‌ای که در محیط برنامه‌نویسی MATLAB نوشته شده بود برای یادگیری ماشین بر اساس پاسخ الکتروشیمیایی نمونه‌ها استفاده شد. این برنامه شامل مدل رگرسیونی شبکه عصبی مصنوعی برای پیش‌بینی غلظت نیترات در نمونه‌ها با دو ویژگی ورودی بود: جریان کاتدی محدودکننده (به عنوان پاسخ الکتروشیمیایی نمونه) و طول عمر آنزیم ثبت‌شده روی الکتروود کار. تعداد نورون‌ها در لایه پنهان برابر با ۱۰ انتخاب شد. پارامترهای وزن و بایاس این نورون‌ها با استفاده از یک الگوریتم بهینه‌سازی فراابتکاری بهینه‌سازی شدند تا کارآمدترین ساختمان شبکه در پیش‌بینی غلظت نیترات در نمونه‌های تحت اندازه‌گیری حاصل شود.

در این مطالعه از الگوریتم شاهین هریس به منظور بهینه‌سازی ساختمان شبکه عصبی مصنوعی استفاده شد. این الگوریتم که در سال ۲۰۱۹ معرفی شد، رویکردی بهینه‌سازی است مبتنی بر ازدحام که شامل هر دو مرحله جستجو و استخراج است (Heidari *et al.*, 2019). در این روش، جمعیت اولیه از شاهین‌ها به‌طور تصادفی در صفحه پاسخ قرار می‌گیرد و فرآیند هجوم به طعمه را از جهات مختلف شبیه‌سازی می‌کند. اصل اساسی این روش آن است که به طور مکرر شاهین‌ها شکار، یعنی خرگوش، را غافلگیر و انرژی آن را در چندین مرحله تخلیه می‌کنند، بنابراین، امکان به دام انداختن خرگوش در

1- Sigma Aldrich, Germany

2- PalmSens, Netherland

از رابطه ۱ بین صفر و یک نرمال‌سازی شد تا امکان مقایسه میان عملکرد روش با تحقیقات پیشین، که آنها نیز مقادیر غلظت را در همین بازه نرمال‌سازی کرده بودند، فراهم گردد.

$$x_n = \frac{x_0 - x_{\min}}{x_{\max} - x_{\min}} \quad (1)$$

که در آن،

$x_n$  = مقدار غلظت نیترات پس از نرمال‌سازی؛  
 $x_0$  = مقدار اولیه غلظت؛ و  $x_{\min}$  و  $x_{\max}$  به ترتیب کمترین و بالاترین مقدار غلظت نیترات در مجموعه داده. از اعتبارسنجی عرضی پنج‌تایی برای ارزیابی عملکرد زیست‌حسگر هوشمند استفاده شد. در این روش، تمامی داده‌های پایگاه داده به پنج قسمت مساوی تقسیم می‌شود و در مرحله اول یک قسمت از این داده‌ها به عنوان آزمون انتخاب می‌شود، در حالی که چهار قسمت دیگر برای آموزش ماشین استفاده می‌شوند. در مرحله دوم، قسمت دیگری به عنوان آزمون انتخاب می‌شود و بقیه داده‌ها بار دیگر برای آموزش استفاده می‌شوند. این عملیات پنج بار تکرار می‌شود تا هر قسمت یک بار به عنوان آزمون در نظر گرفته شده باشد. مزیت این روش نسبت به روش‌های دیگر، مانند انتخاب تصادفی داده‌های آزمون، این است که تمام داده‌ها حداقل یک بار به عنوان آزمون بررسی می‌شوند. از آنجا که شبکه عصبی مصنوعی علاوه بر داده‌های آموزش و آزمون، به داده‌های اعتبارسنجی نیاز دارد تا کیفیت آموزش شبکه را تشخیص دهد، ۲۰ درصد از داده‌های آموزش در هر مرحله، به فرآیند اعتبارسنجی اختصاص داده شد. ضریب تبیین ( $R^2$ ) (رابطه ۲) به عنوان معیارهای ارزیابی خطا در نظر گرفته شد.

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (x_p - x_0)^2}{\sum_{i=1}^n (x_0 - \bar{x}_0)^2} \quad (2)$$

کوتاه‌ترین زمان ممکن فراهم می‌شود. شاهین‌ها به دلیل الگوهای فرار خرگوش در حال چند سناریو شکار هستند. این روش مبتنی بر مهار و هدایت انرژی برای ایجاد تعادل بین استراتژی‌های جستجو و استخراج با هدف نهایی دستیابی به راه حل بهینه در سریع‌ترین زمان ممکن دارد. روش پیاده‌سازی الگوریتم شاهین‌هریس در این پژوهش بر اساس تحقیق حیدری و همکاران (Heidari et al., 2019) انتخاب شد. تابع برازندگی (هدف) طی عملیات بهینه‌سازی به حداکثر رساندن ضریب تبیین ( $R^2$ ) پیش‌بینی با استفاده از شبکه عصبی مصنوعی بود. شرط توقف در بهینه‌سازی، رسیدن به حداکثر تعداد تکرار (۱۰۰ تکرار) بود.

یک پایگاه داده برای آموزش شبکه عصبی مصنوعی ایجاد شد تا مدلی قابل اعتماد برای تشخیص غلظت نیترات در نمونه ناشناخته ارائه شود. برای تهیه پایگاه داده، نمونه‌های استاندارد نیترات تهیه شد، به این صورت که مقادیر مشخص از ترکیب  $\text{NaNO}_3$  به محلول الکترولیت بی‌اثر اضافه شد تا غلظت‌های مختلف نیترات (۳۰ نمونه) از صفر تا ۱۵۰۰ میکرومولار تهیه شود. پاسخ الکتروشیمیایی نمونه‌های استاندارد تهیه شده بلافاصله پس از تثبیت آنزیم تا ۴۰ روز پس از تثبیت به صورت هر دو روز یک بار به کمک زیست‌حسگر الکتروشیمیایی ثبت شد. به علاوه، عمر آنزیم تثبیت شده نیز در کنار پاسخ الکتروشیمیایی برای هر نمونه ثبت گردید. در این شرایط، ۶۰۰ مشاهده برای تشکیل پایگاه داده به کار گرفته شد. در نتیجه، دو ویژگی جریان کاتدی محدودکننده و عمر آنزیم به عنوان ورودی‌های ماشین و غلظت نیترات در نمونه به عنوان خروجی ماشین در نظر گرفته شدند. به هنگام تشکیل پایگاه داده، غلظت نیترات نمونه‌ها با استفاده

که در آن،

$x_0 =$  غلظت نمونه‌های استاندارد نیترات؛  $x_p =$  مقدار غلظت پیش‌بینی شده با استفاده از شبکه عصبی مصنوعی؛ و  $n =$  تعداد نمونه‌ها. هرچه مقدار  $R^2$  بالاتر و به ۱ نزدیک‌تر باشد، عملکرد مدل یادگیری ماشین بهتر است.

## نتایج و بحث

نتایج ولتامتری چرخه‌ای بخش الکتروشیمیایی زیست‌حسگر به ازای غلظت‌های صفر تا ۱۵۰۰ میکرومولار نیترات در شکل ۲-الف آورده شده است. در این منحنی‌ها، مسیر زیرین نشان‌دهنده واکنش کاتدی است که در آن کاهش نیترات به نیتريت صورت می‌گیرد، در حالی که مسیر بالایی نشان‌دهنده واکنش آنودی است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، زمانی که غلظت نیترات در نمونه‌ها صفر است، پیک‌های کاتدی و آنودی در مسیرهای رفت و برگشت منحنی دیده می‌شوند. پتانسیل میانگین این پیک‌ها نشان‌دهنده پتانسیل اکسایش-کاهش استاندارد واکنش‌گر واسطه است. با افزایش غلظت نیترات، این پیک‌ها از بین می‌روند و جریان کاتدی محدودکننده روی منحنی‌های ولتاموگرام دیده می‌شود. با افزایش غلظت نیترات از ۳۰۰ تا ۱۵۰۰ میکرومولار، این جریان محدودکننده افزایش می‌یابد. اما هنگامی که غلظت نیترات به ۱۵۰۰ میکرومولار می‌رسد، به نظر می‌آید که مسیرهای رفت و برگشت ولتامتری با یکدیگر منطبق شده و منحنی به شکل تابع سیگموئیدی ظاهر شده است. این موضوع نشان‌دهنده اشباع شدن لایه نفوذی از نیترات است. در این شرایط، نفوذ یون‌های نیترات به این لایه آنقدر زیاد است که بیوکاتالیست آنزیمی توانایی

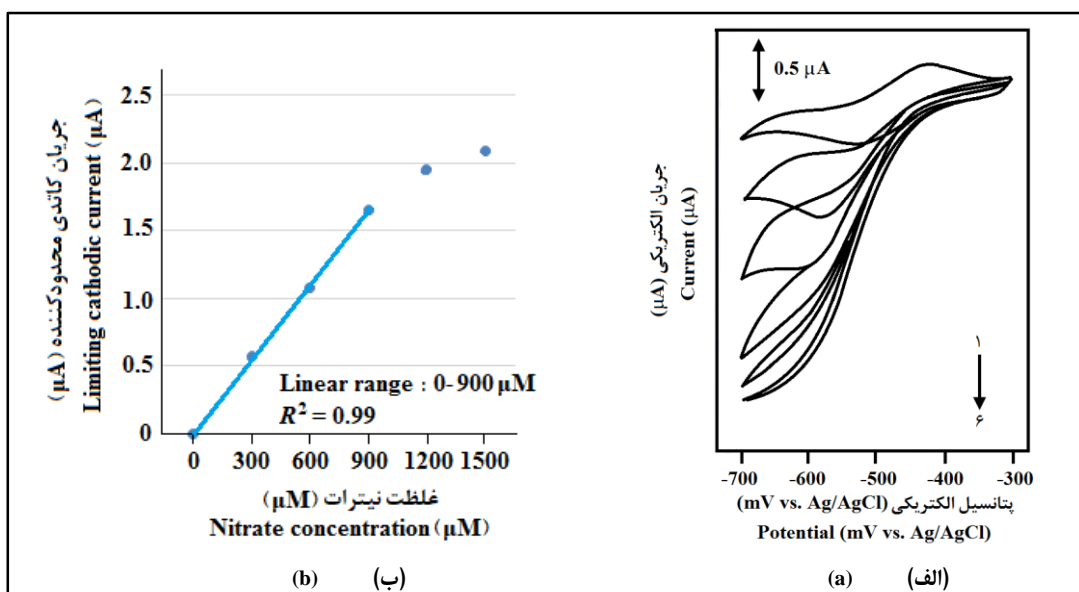
کاهش نیترات به نیتريت را ندارد و شرایط اشباع به وجود می‌آید.

شکل ۲-ب جریان کاتدی محدودکننده را در برابر غلظت‌های نیترات از صفر تا ۱۵۰۰ میکرومولار نشان می‌دهد. این نتایج متعلق به نمونه‌های استاندارد نیترات با pH برابر ۷/۴ است که بلافاصله پس از آماده‌سازی الکتروود آزمایش شدند. این شکل نشان می‌دهد که ناحیه خطی حسگر بین صفر تا ۹۰۰ میکرومولار ( $R^2 = 0.99$ ) بوده است.

اگرچه رفتار خطی زیست‌حسگر در ناحیه صفر تا ۹۰۰ میکرومولار مشاهده شد، پاسخ الکتروشیمیایی نمونه‌های حاوی غلظت‌های نیترات از صفر تا ۱۵۰۰ میکرومولار به روش‌های یادگیری ماشین آموزش داده شد تا توانایی ماشین در پیش‌بینی رفتار غیرخطی زیست‌حسگر نیز بررسی شود. غلظت نیترات در برخی رودخانه‌های آلوده در فصل‌های سرد سال گاهی تا سطح ۱۳۰۰ تا ۱۴۰۰ میکرومولار نیز افزایش می‌یابد و عملکرد مناسب زیست‌حسگر برای اندازه‌گیری این سطح از آلودگی می‌تواند کاربرد آن را افزایش دهد. عملکرد پیش‌بینی شبکه‌های عصبی مصنوعی با مقادیر آبرپارامترهای بهینه‌نشده و بهینه‌شده توسط الگوریتم شاهین هریس در شکل ۳ نشان داده شده است. از آنجاکه مقادیر  $R^2$  با در نظر گرفتن داده‌های نرمال‌سازی شده بین صفر و یک محاسبه شدند، نتایج مدل‌ها قابل مقایسه بودند. این شکل نشان می‌دهد که به طور کلی، عملکرد شبکه بهینه‌شده به شکل قابل توجهی مناسب‌تر از عملکرد شبکه بهینه‌نشده در خلال آزمایش بود. با استفاده از مدل بهینه‌شده، دستگاه زیست‌حسگر هوشمند توانایی پیش‌بینی مقدار نیترات در نمونه‌ها را با مقادیر  $R^2$  بالاتر از ۰/۹۵ حتی ۳۰ روز پس از

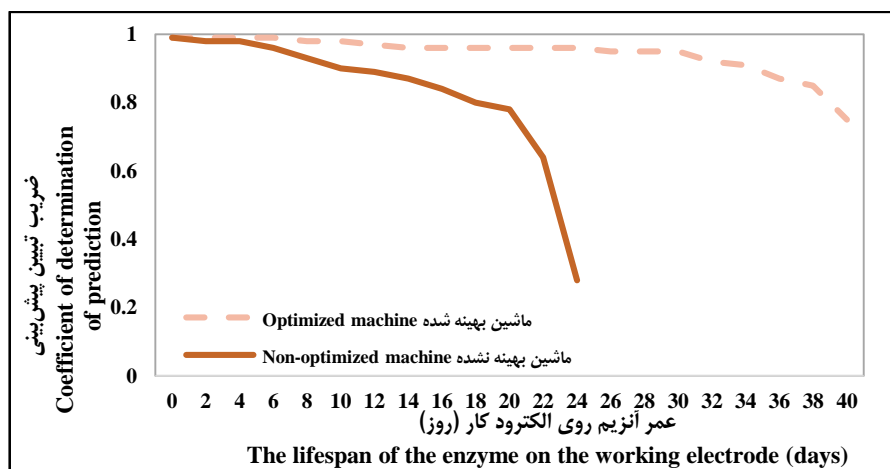
عملکرد شبکه‌های عصبی مصنوعی در مسائل رگرسیونی نشان داده‌اند. مطابق شکل ۳، در روزهای اولیه آزمایش اگرچه هر دو مدل بهینه و غیربهینه عملکرد قابل قبولی در پیش‌بینی غلظت نیترات داشتند، با گذشت زمان، عملکرد ماشین غیربهینه کاهش یافت. به نظر می‌رسد دلیل این مشاهده روابط پیچیده بین ورودی‌ها و خروجی مدل بود.

آماده‌سازی الکتروود داشت. در حالی که شبکه عصبی مصنوعی غیربهینه منجر به مقادیر  $R^2$  در حدود ۰/۹ تنها ۱۰ روز پس از آماده‌سازی الکتروود شد. مشابه نتایج این تحقیق، بسیاری از مطالعات (Khandelwal & Armaghani, 2016; Kumar *et al.*, 2019; Gomes *et al.*, 2019; *al.*, 2019) توانایی الگوریتم‌های بهینه‌سازی فراابتکاری را در بهبود



شکل ۲- الف) نتایج ولتامتری چرخه‌ای آنزیم با منشأ باکتری برای غلظت‌های نیترات (۱) صفر، (۲) ۳۰۰، (۳) ۶۰۰، (۴) ۹۰۰، (۵) ۱۲۰۰ و (۶) ۱۵۰۰ میکرومولار و ب) نمودار واسنجی زیست‌حسگر به همراه ناحیه خطی پاسخ

Fig. 2- Cyclic voltammetry results of the bacterial-based enzyme for nitrate concentrations equal to (1) 0, (2) 300, (3) 600, (4) 900, (5) 1200, and (6) 1500 µM and b) Calibration graph with linear range of response



شکل ۳- ضریب تبیین مدل‌ها در پیش‌بینی غلظت نیترات نمونه‌ها طی ۴۰ روز پس از تثبیت آنزیم روی الکتروود کار

Fig. 3- The coefficient of determination of the models in predicting the nitrate concentration of the samples within 40 days after the immobilization of the enzyme on the working electrode

شده در این مطالعه با صرفه است زیرا نیازی به آماده‌سازی مکرر الکتروود ندارد.

در ساعات اولیه پس از تثبیت آنزیم روی الکتروود کار، ویژگی‌های الکتروشیمیایی نمونه‌ها مشابه یافته‌های گزارش شده در تحقیقات پیشین بود (Kalimuthu *et al.*, 2015). رفتار الکتروشیمیایی واحد زیست‌حسگر در این دوره کوتاه، واکنش کاهش کاتالیستی نیترات به نیتريت را در حضور یک واکنش‌گر واسطه توصیف می‌کند. با این حال، پس از چند روز، پاسخ الکتروشیمیایی زیست‌حسگر به دلیل کاهش قابل توجه فعالیت آنزیمی به طور کامل تغییر کرد. این امر بر نقش مدل‌های یادگیری ماشین در بهبود عملکرد یک روش تجزیه‌ای تأکید می‌کند.

فعالیت کاتالیستی اغلب آنزیم‌های استخراج شده از موجودات زنده به طور قابل توجهی طی زمان کاهش می‌یابد (Kalimuthu *et al.*, 2016) و نتایج ولتامتری به طور قابل توجهی تغییر می‌کند و بنابراین نمی‌توان از آن‌ها برای هدف‌های اندازه‌گیری برای دستگاه‌های تجاری استفاده کرد. تکرارپذیری نتایج حسگر یکی دیگر از ویژگی‌های عملکردی است که عملکرد حسگر را در اعمال نتایج مشابه برای نمونه‌های مایع با غلظت مشابه ترکیب مورد اندازه‌گیری نشان می‌دهد؛ مقدار کمی آن برای زیست‌حسگرهای هوشمند را می‌توان بر اساس عملکرد واحد تصمیم‌گیری به دست آورد که در این مطالعه به دلیل مقادیر بالای ضریب تبیین حتی ۳۰ روز پس از تثبیت آنزیم روی الکتروود کار قابل قبول بود.

تکرارپذیری زیست‌حسگر با اندازه‌گیری میدانی غلظت نیترات در نمونه‌های آب رودخانه‌ای دلخواه، آب لوله‌کشی و آب معدنی تجاری با پنج تکرار

مشابه دیگر حسگرها، ویژگی‌های عملکردی زیست‌حسگر مانند محدوده خطی، حساسیت و کمترین حد تشخیص نیز باید برای مقایسه عملکرد آنها گزارش شود. عموماً، زیست‌حسگرها بدون تأخیر پس از آماده‌سازی الکتروود (یعنی تثبیت آنزیم روی سطح الکتروود کار) برای اندازه‌گیری استفاده می‌شوند. زمانی که در مورد زیست‌حسگرهای هوشمند صحبت می‌کنیم، داده‌های الکتروشیمیایی نمونه‌های ثبت‌شده توسط واحد ولتامتری زیست‌حسگر ممکن است طی آزمایش‌ها غیرخطی باشند. با این حال، واحد تصمیم‌گیری قادر است میزان نیترات نمونه‌ها را با کارایی قابل قبول پیش‌بینی کند. از طرف دیگر، کمترین غلظت نیترات در نمونه استاندارد مورد ارزیابی ۱ میکرومولار بود که واحد هوشمند زیست‌حسگر توانسته است غلظت این نمونه را نیز با خطای کمی پیش‌بینی کند. بنابراین، مشابه دیگر سامانه‌های هوشمند، عملکرد بیوسنسور معرفی شده با استفاده از اعتبارسنجی عرضی پنج‌تایی ارزیابی می‌شود، و نه ویژگی‌هایی مانند محدوده خطی، حساسیت و کمترین حد تشخیص (Asefpour Vakilian & Massah, 2018b).

یافته اصلی این تحقیق بر ارائه یک تکنیک یادگیری ماشین برای افزایش دوام الکتروود کار آماده شده در ساختمان زیست‌حسگر متکی است. این موضوع در پایش‌های زیست‌محیطی ضروری است، به خصوص زمانی که انتقال نمونه‌های مایع به آزمایشگاه برای تعیین غلظت نیترات ناممکن باشد. این شرایط زمانی اتفاق می‌افتد که تصمیم گرفته شود به طور مثال غلظت نیترات دریاچه یا رودخانه‌ای اندازه‌گیری شود. علاوه بر این، دستگاه معرفی



که زمان بر است و به ابزارهای گران قیمت نیاز دارد. با توجه به نتایج، انحراف استاندارد نسبی نتایج دستگاه زیست حسگر پیشنهادی با افزایش طول عمر آنزیم از ۵ روز به ۳۰ روز افزایش یافته است. با این حال، انحراف استاندارد اندازه گیری های دستگاه زیست حسگر هوشمند پیشنهادی همچنان کمتر از بود تا روش آزمایشگاهی معمولی، که نشان دهنده کارایی قابل قبول دستگاه هوشمند پیشنهادی است. مقادیر بازیابی بر حسب درصد برای روش طیفسنجی نیز در این جدول نشان داده شده است که بر اساس میانگین مقادیر غلظت اندازه گیری شده نسبت به مقادیر غلظت استاندارد اضافه شده به نمونه در طول اندازه گیری به دست آمده اند.

ارزیابی شد. جدول ۱ میانگین و انحراف معیار اندازه گیری ها را با استفاده از زیست حسگر هوشمند معرفی شده نشان می دهد که از الگوریتم بهینه شاهین هریس برای بهبود شبکه استفاده می کند. جدول ۱ همچنین میزان نیترات اندازه گیری شده با روش طیفسنجی مرسوم را بر اساس روش کاتالدو و همکاران (Cataldo *et al.*, 1975) نشان می دهد. در این روش آزمایشگاهی، نیتراسیون سالیسیلیکاسید کاتالیز شده با اسید محصولی رنگی تولید می کند که با طیفسنجی UV-Vis قابل اندازه گیری است. همان طور که در این جدول مشاهده می شود، مقدار نیترات به دست آمده توسط دستگاه پیشنهادی تقریباً مشابه با روش های آزمایشگاهی معمولی است

جدول ۱- مقایسه سامانه زیست حسگر هوشمند پیشنهادی و روش طیفسنجی مرسوم در تعیین غلظت نیترات

Table 1- Comparison of the proposed smart biosensor and the conventional spectroscopic method in determining nitrate concentration

غلظت نیترات (میکرومولار)				عمر آنزیم			نمونه آب
Nitrate concentration ( $\mu\text{M}$ )				روز			
روش طیفسنجی متداول			زیست حسگر هوشمند پیشنهادی		Enzyme lifespan (days)	Water sample	
Conventional spectroscopy			Proposed smart biosensor				
بازیابی (درصد)	انحراف استاندارد	میانگین	انحراف استاندارد	میانگین			
Recovery (%)	Standard deviation	Mean	Standard deviation	Mean			
94	11.5	224.1	4.3	235.3	5	آب رودخانه	
94	11.5	224.1	8.9	242.7	30	Rivier water	
96	2.8	39.2	0.8	38.5	5	آب لوله کشی شهری	
96	2.8	39.2	1.7	39.2	30	Tap water	
92	2.2	21.3	1.5	29.2	5	آب معدنی تجاری	
92	2.2	21.3	2.2	27.6	30	Natural mineral water	

شوند و پیشامدهای نامطلوبی برای سلامت انسان و دیگر موجودات زنده داشته باشند. استفاده از حسگر زیستی معرفی شده برای تهیه نقشه های آلودگی آسان تر از قبل خواهد بود، زیرا دیگر نیازی به انتقال نمونه های مایع از محل نمونه برداری به آزمایشگاه برای اندازه گیری نخواهد بود و دستگاه زیست حسگر

جدول ۱ نشان می دهد هر دو روش سنجش زیستی و طیفسنجی مرسوم غلظت نیترات بالاتری را در نمونه های آب رودخانه، نسبت به نمونه آب های لوله کشی و معدنی تجاری، نشان دادند. این نتیجه قابل پیش بینی بود، زیرا کودهای مبتنی بر نیتروژن می توانند از مزارع کشاورزی به منابع آب شسته

هوشمند در پیش‌بینی غلظت نیترات را نشان می‌دهد. با توجه به این جدول، دوام الکتروود در زیست‌حسگر هوشمند معرفی شده در این تحقیق بالاتر از مقادیری است که در مقالات پیشین گزارش شده است. این موضوع به محققان حوزه ارزیابی کیفیت محیط زیست کمک می‌کند تا از این دستگاه برای تشخیص آلودگی نیترات در محیط و به صورت میدانی استفاده کنند. اگرچه شبکه عصبی مصنوعی پیشتر در این دستگاه‌ها استفاده شده است (Asefpour Vakilian & Massah, 2018a)، زیست‌حسگر آن‌ها به یک واحد طیف‌سنجی قابل حمل در کنار واحد الکتروشیمیایی سه الکتروودی مجهز شده بود که هزینه دستگاه را به طور قابل توجهی افزایش داد. واحد استنتاج فازی نیز برای چنین حسگرهایی گزارش شده است (Asefpour Vakilian & Massah, 2018b). با این حال، این روش‌ها نیاز به تعریف قوانین فازی و تعیین مناسب توابع عضویت فازی برای ورودی و خروجی مدل دارند. حسگرهای هوشمند می‌توانند برای ظهور نسل بعدی دستگاه‌های قابل حمل، که می‌توانند پاسخی انتخابی و اختصاصی به ترکیب مورد اندازه‌گیری نشان دهند، مفید باشند. استفاده از نانوذرات، مانند نانوذرات طلا و نقره، برای بهبود فعالیت بیوکاتالیستی (Asefpour Vakilian, 2020a; Tabibi *et al.*, 2022) یا توسعه روش‌های یادگیری ماشینی کارآمدتر برای بهبود عملکرد واکنش اکسایش-کاهش این حسگرهای زیستی پیشنهاد می‌شود.

قابل حمل هوشمند می‌تواند صدها اندازه‌گیری را در محل اجرا کند. کاربرد زیست‌حسگرها فقط برای اندازه‌گیری آلودگی‌های آب نیست، امروزه از حسگرهای زیستی هوشمند برای تجزیه و تحلیل کمبود مواد مغذی و دیگر تنش‌ها در گیاهان و میوه استفاده شده است (Asefpour Vakilian, 2020b; Hashemi Shabankareh *et al.*, 2023; Mohammadi & Asefpour Vakilian, 2023). با وجود قابل حمل بودن زیست‌حسگرهای آنزیمی و عملکرد مناسب‌تر آن‌ها (به ویژه، حساسیت و تکرارپذیری بالاتر) نسبت به روش‌های متداول آزمایشگاهی، اما قیمت بالاتر و هزینه تمام‌شده برای هر اندازه‌گیری باعث شده است توسعه تجاری این روش‌ها امروزه محدود شود. مواد مصرفی مورد نیاز مانند آنزیم و واکنش‌گر واسطه در این تحقیق به شکل آماده برای مصرف تهیه شده بود که این موضوع می‌تواند این نوع اندازه‌گیری را گران‌قیمت کند. در تولید انبوه این‌گونه زیست‌حسگرها می‌توان آنزیم مورد نظر را از باکتری‌هایی که در محیط آزمایشگاهی کشت داده شده است، جداسازی و خالص کرد تا بتوان هزینه‌های ساخت زیست‌حسگر برای ورود به بازار را به میزان قابل توجهی کاهش داد. همچنین می‌توان از الکترودهای کربن چاپ‌شده روی لایه پلیمری به جای الکترودهای مورد استفاده در این تحقیق بهره گرفت که می‌تواند قیمت رقابتی این دستگاه‌ها را در نسل آینده زیست‌حسگرهای تجاری نوید دهد.

جدول ۲ مقایسه‌ای از عملکرد زیست‌حسگرهای

جدول ۲- مقایسه بیوسنسورهای هوشمند در پیش بینی غلظت نیترات  
Table 2- Comparison of smart biosensors in predicting nitrate concentration

منبع Reference	ضریب تعیین پیش بینی Coefficient of determination of prediction	دوام آنزیم روی الکتروود کار (روز) Durability of the enzyme on the working electrode (days)	روش یادگیری ماشین مورد استفاده The utilized machine learning model	داده های زیست سنجی Biosensing data
	0.90	10	بیزین ساده Naïve Bayesian	
	0.90	10	درخت تصمیم Decision tree	
Asefpour Vakilian & Massah, 2018a	0.84	10	جنگل تصادفی Random forest	داده های الکتروشیمیایی به همراه داده های طیف سنجی
	0.89	10	شبکه عصبی مصنوعی Artificial neural networks	Electrochemical and spectroscopic data
	0.96	10	ماشین بردار پشتیبان Support vector machine	
	0.92	10	ماشین بردار پشتیبان کمترین مربعات LS-Support vector machine	
Asefpour Vakilian & Massah, 2018b	0.95	-	سامانه استنتاج فازی Fuzzy inference system	
Massah & Asefpour Vakilian, 2019	0.93	10	ماشین بردار پشتیبان Support vector machine	
Asefpour Vakilian, 2022	0.97	14	شبکه عصبی مصنوعی بهینه شده با الگوریتم ژنتیک ANN optimized with genetic algorithm	داده های الکتروشیمیایی Electrochemical data
Asefpour Vakilian, 2022	0.97	14	شبکه عصبی مصنوعی بهینه شده با الگوریتم توده نقاط ANN optimized with particle swarm optimization	
این تحقیق This study	0.95	30	شبکه عصبی مصنوعی بهینه شده با الگوریتم شاهین هریس ANN optimized with Harris hawks optimization	

کربنی و مواد پلیمری برای بهبود فعالیت آنزیمی بدون در نظر گرفتن یک واحد تصمیم گیری بر پایه یادگیری ماشین است (Zheng *et al.*, 2021; Chaudhary *et al.*, 2023). در برخی تحقیقات اخیر که از یادگیری ماشین در ساختار زیست حسگر استفاده شده است، تمرکز بر پیش بینی غلظت ماده مورد اندازه گیری (آنالیت) با داشتن پاسخ نوری/الکتروشیمیایی به عنوان ورودی ماشین بوده

بررسی جدول ۲ نشان می دهد که تحقیقات در زمینه زیست حسگر هوشمند که از یادگیری ماشین برای مدل سازی رفتار بیوسنسور طی عمرهای مختلف آنزیم بهره می گیرد، تنها توسط یک گروه تحقیقاتی بوده است. به طور کلی در زمینه زیست حسگرها هنگامی که کلمه "هوشمند" به کار می رود، معنای متداول آن به کارگیری یک ریزمحیط منعطف مناسب مبتنی بر نانوذرات فلزی، نانولوله های

هریس برای پیش‌بینی غلظت نیترات در یک زیست‌حسگر الکتروشیمیایی سه الکترودی استفاده شد. نتایج تحقیق نشان داد که دستگاه آموزش دیده می‌تواند مقدار نیترات را در نمونه‌ها با عملکرد امیدوارکننده پیش‌بینی کند. به کارگیری از روش پیشنهادی منجر به عملکرد قابل اعتماد پیش‌بینی نیترات در ۳۰ روز پس از تثبیت آنزیم نیترات‌ردوکتاز روی الکتروود کربن شیشه‌ای با ضریب تبیین ۰/۹۵ شد. یافته‌های این مطالعه می‌تواند برای توسعه نسل نوظهور حسگرهای زیستی مقرون به صرفه برای پایش کیفیت محیط زیست استفاده شود.

است (Kokabi *et al.*, 2023; Bhaiyya *et al.*, 2024). در این پژوهش‌ها، متغیرهای کارکردی زیست‌حسگر (مانند طول عمر آنزیم) به عنوان ورودی مدل لحاظ نشده است. این موضوع نه تنها برای زیست‌حسگرهای نیترات، بلکه برای زیست‌حسگرهای دیگر نیز صادق است. در نتیجه، امکان مقایسه نتایج تحقیق حاضر با این‌گونه تحقیقات وجود نداشت.

### نتیجه‌گیری

در این مطالعه، مدل رگرسیونی شبکه عصبی مصنوعی بهینه‌شده با الگوریتم فراابتکاری شاهین

### قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی بنیاد ملی نخبگان در قالب طرح شهید احمدی روشن با شماره قرارداد ۱۵/۸۴۴۴ صورت پذیرفت.

### تعارض منافع

نویسندگان در خصوص مقاله ارائه شده به طور کامل از سوء اخلاق نشر، از جمله سرقت ادبی، سوء رفتار، جعل داده‌ها و یا ارسال و انتشار دوگانه، پرهیز نموده‌اند و منافعی تجاری در این راستا وجود ندارد.

### مراجع

- Ahmad, R., Bhat, K. S., Ahn, M. S., & Hahn, Y. B. (2017). Fabrication of a robust and highly sensitive nitrate biosensor based on directly grown zinc oxide nanorods on a silver electrode. *New Journal of Chemistry*, 41, 10992-10997. <https://doi.org/10.1039/C7NJ02526B>.
- Al Mamun, M., Wahab, Y. A., Hossain, M. M., Hashem, A., & Johan, M. R. (2021). Electrochemical biosensors with aptamer recognition layer for the diagnosis of pathogenic bacteria: Barriers to commercialization and remediation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 145, 116458. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116458>.
- Alahi, M. E. E., & Mukhopadhyay, S. C. (2018). Detection methods of nitrate in water: A review. *Sensors and Actuators A: Physical*, 280, 210-221. <https://doi.org/10.1016/j.sna.2018.07.026>.
- Asefpour Vakilian, K. (2020a). Determination of nitrogen deficiency-related microRNAs in plants using fluorescence quenching of graphene oxide nanosheets. *Molecular and Cellular Probes*, 52, 101576. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2020.101576>.

- Asefpour Vakilian, K. (2020b). Machine learning improves our knowledge about miRNA functions towards plant abiotic stresses. *Scientific Reports*, *10*, 3041. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59981-6>.
- Asefpour Vakilian, K. (2022). A nitrate enzymatic biosensor based on optimized machine learning techniques. *Proceedings of the 9<sup>th</sup> Iranian Joint Congress on Fuzzy and Intelligent Systems*. Apr. 2-4, Bam, Iran. <https://doi.org/10.1109/CFIS54774.2022.9756481>. (in Persian)
- Asefpour Vakilian, K., & Massah, J. (2018a). A portable nitrate biosensing device using electrochemistry and spectroscopy. *IEEE Sensors Journal*, *18*, 3080-3089. <https://doi.org/10.1109/JSEN.2018.2809493>.
- Asefpour Vakilian, K., & Massah, J. (2018b). A fuzzy-based decision making software for enzymatic electrochemical nitrate biosensors. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, *177*, 55-63. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2018.04.016>.
- Bendikov, T. A., Kim, J., & Harmon, T. C. (2005). Development and environmental application of a nitrate selective microsensor based on doped polypyrrole films. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *106*, 512-517. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2004.07.018>.
- Bhaiyya, M., Panigrahi, D., Rewatkar, P., & Haick, H. (2024). Role of machine learning assisted biosensors in point-of-care-testing for clinical decisions. *ACS Sensors*, *9*, 4495-4519. <https://doi.org/10.1021/acssensors.4c01582>.
- Bui, M. P. N., Brockgreitens, J., Ahmed, S. & Abbas, A. (2016). Dual detection of nitrate and mercury in water using disposable electrochemical sensors. *Biosensors and Bioelectronics*, *85*, 280-286. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.05.017>.
- Can, F., Ozoner, S. K., Ergenekon, P., & Erhan, E. (2012). Amperometric nitrate biosensor based on Carbon nanotube/Polypyrrole/Nitrate reductase biofilm electrode. *Materials Science and Engineering: C*, *32*, 18-23. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2011.09.004>.
- Cataldo, D. A., Maroon, M., Schrader, L. E., & Youngs, V. L. (1975). Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, *6*, 71-80. <https://doi.org/10.1080/00103627509366547>.
- Chaudhary, V., Rustagi, S., & Kaushik, A. (2023). Bio-derived smart nanostructures for efficient biosensors. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, *42*, 100817. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2023.100817>.
- Chou, S. S., Chung, J. C., & Hwang, D. F. (2003). A high performance liquid chromatography method for determining nitrate and nitrite levels in vegetables. *Journal of Food and Drug Analysis*, *11*, 11. <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2702>.
- Cui, F., Yue, Y., Zhang, Y., Zhang, Z., & Zhou, H. S. (2020). Advancing biosensors with machine learning. *ACS Sensors*, *5*, 3346-3364. <https://doi.org/10.1021/acssensors.0c01424>.
- Gao, L., Barber-Singh, J., Kottegoda, S., Wirtshafter, D., & Shippy, S. A. (2004). Determination of nitrate and nitrite in rat brain perfusates by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, *25*, 1264-1269. <https://doi.org/10.1002/elps.200305840>.
- Gomes, G. F., De Almeida, F. A., Junqueira, D. M., da Cunha Jr, S. S., & Ancelotti Jr, A. C. (2019). Optimized damage identification in CFRP plates by reduced mode shapes and GA-ANN methods. *Engineering Structures*, *181*, 111-123. <https://doi.org/10.1016/j.engstruct.2018.11.081>.
- Hashemi Shabankareh, S., Asghari, A., Azadbakht, M., & Asefpour Vakilian, K. (2023). Physical and physiological characteristics, as well as miRNA concentrations, are affected by the storage time of tomatoes. *Food Chemistry*, *429*, 136792. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136792>.

- Heidari, A. A., Mirjalili, S., Faris, H., Aljarah, I., Mafarja, M., & Chen, H. (2019). Harris hawks optimization: Algorithm and applications. *Future Generation Computer Systems*, 97, 849-872. <https://doi.org/10.1016/j.future.2019.02.028>.
- Huber, C., Klimant, I., Krause, C., Werner, T., & Wolfbeis, O. S. (2001). Nitrate-selective optical sensor applying a lipophilic fluorescent potential-sensitive dye. *Analytica Chimica Acta*, 449, 81-93. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)01363-0](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)01363-0).
- Kalimuthu, P., Fischer-Schrader, K., Schwarz, G. & Bernhardt, P. V. (2013). Mediated electrochemistry of nitrate reductase from *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Physical Chemistry B*, 117, 7569-7577. <https://doi.org/10.1021/jp404076w>.
- Kalimuthu, P., Fischer-Schrader, K., Schwarz, G., & Bernhardt, P. V. (2015). A sensitive and stable amperometric nitrate biosensor employing *Arabidopsis thaliana* nitrate reductase. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 20, 385-393. <https://doi.org/10.1007/s00775-014-1171-0>.
- Kalimuthu, P., Ringel, P., Kruse, T., & Bernhardt, P. V. (2016). Direct electrochemistry of nitrate reductase from the fungus *Neurospora crassa*. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1857, 1506-1513. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.04.001>.
- Khandelwal, M., & Armaghani, D. J. (2016). Prediction of drillability of rocks with strength properties using a hybrid GA-ANN technique. *Geotechnical and Geological Engineering*, 34, 605-620. <https://doi.org/10.1007/s10706-015-9970-9>.
- Kim, W., Bae, S., Park, K., Lee, S., Choi, Y., Han, S., & Koh, Y. (2011). Biochemical characterization of digestive enzymes in the black soldier fly, *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 14(1), 11-14. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2010.11.003>.
- Kokabi, M., Tahir, M. N., Singh, D., & Javanmard, M. (2023). Advancing healthcare: synergizing biosensors and machine learning for early cancer diagnosis. *Biosensors*, 13(9), 884. <https://doi.org/10.3390/bios13090884>.
- Kumar, V., Kumar, A., Chhabra, D., & Shukla, P. (2019). Improved biobleaching of mixed hardwood pulp and process optimization using novel GA-ANN and GA-ANFIS hybrid statistical tools. *Bioresource Technology*, 271, 274-282. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.115>.
- Lambeck, I., Chi, J. C., Krizowski, S., Mueller, S., Mehlmer, N., Teige, M., & Schwarz, G. (2010). Kinetic analysis of 14-3-3-inhibited *Arabidopsis thaliana* nitrate reductase. *Biochemistry*, 49, 8177-8186. <https://doi.org/10.1021/bi1003487>.
- Legnerová, Z., Solich, P., Sklenářová, H., Šatínský, D., & Karlíček, R. (2002). Automated simultaneous monitoring of nitrate and nitrite in surface water by sequential injection analysis. *Water Research*, 36, 2777-2783. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00513-9](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00513-9).
- Massah, J., & Asefpour Vakilian, K. (2019). An intelligent portable biosensor for fast and accurate nitrate determination using cyclic voltammetry. *Biosystems Engineering*, 177, 49-58. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2018.09.007>.
- Mohammadi, P., & Asefpour Vakilian, K. (2023). Machine learning provides specific detection of salt and drought stresses in cucumber based on miRNA characteristics. *Plant Methods*, 19, 123. <https://doi.org/10.1186/s13007-023-01095-x>.
- Sohail, M., & Adeloju, S. B. (2016). Nitrate biosensors and biological methods for nitrate determination. *Talanta*, 153, 83-98. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.03.002>.

- Tabibi, Z., Massah, J., & Asefpour Vakilian, K. (2022). A biosensor for the sensitive and specific measurement of arsenite using gold nanoparticles. *Measurement*, 187, 110281. <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2021.110281>.
- Turner, A. P. (2013). Biosensors: sense and sensibility. *Chemical Society Reviews*, 42, 3184-3196. <https://doi.org/10.1039/C3CS35528D>.
- Yue, X. F., Zhang, Z. Q., & Yan, H. T. (2004). Flow injection catalytic spectrophotometric simultaneous determination of nitrite and nitrate. *Talanta*, 62, 97-101. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(03\)00421-1](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(03)00421-1).
- Zheng, X., Zhang, F., Wang, K., Zhang, W., Li, Y., Sun, Y., Sun, X., Li, C., Dong, B., Wang, L., & Xu, L. (2021). Smart biosensors and intelligent devices for salivary biomarker detection. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 140, 116281. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116281>.

## Research Paper

# An Intelligent Electrochemical Biosensor based on Optimized Machine Learning Methods for Measuring Nitrate Pollution in Water

**K. Asefpour Vakilian**

Assistant Professor, Department of Biosystems Engineering, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. Email: [keyvan.asefpour@gau.ac.ir](mailto:keyvan.asefpour@gau.ac.ir)

Received: 31 October 2024, Accepted: 23 December 2024

[https://doi.org/ 10.22092/amsr.2024.367532.1502](https://doi.org/10.22092/amsr.2024.367532.1502)

### Abstract

During the last two decades, various types of enzymatic biosensors have been introduced for the specific and selective detection of nitrate. These biosensors generally use the redox reaction of nitrate-nitrite to measure nitrate. Since the activity of the enzyme used in the biosensor structure decreases over time, the user of the biosensor should frequently replace the enzyme immobilized onto the working electrode, which increases the detection costs and limits their commercialization. In this study, artificial neural networks (ANNs) have been used to predict nitrate concentration in samples by considering electrochemical data and the decrease in enzyme activity over time. The Harris hawks algorithm was used as a meta-heuristic optimization method to optimize weight and bias hyperparameters of ANNs used in the biosensor decision-making unit. The results showed that the optimized learning algorithm led to a promising prediction of nitrate concentration at the micromolar level with a coefficient of determination of 0.95. In addition, the introduced biosensor could be used up to 30 days after enzyme immobilization. A comparison between the findings of this study and previous studies, that used support vector machines and fuzzy inference systems, showed that ANNs optimized with novel meta-heuristic techniques can provide more reliable prediction results.

**Keywords:** Collective Intelligence, Electrochemical Data, Enzyme, Harris Hawks Algorithm



© 2023 Agricultural Mechanization and Systems Research, Karaj, Iran. This is an open access article distributed under the terms and conditions of the [Creative Commons Attribution 4.0 International \(CC BY 4.0 license\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).