

# CONTROL PREDICTIVO BASADO EN MODELO COMO ALTERNATIVA AL MODO DE OPERACIÓN ESTÁNDAR EN MORBIDOSTATO

Nerea Martínez-López, Adrián Pedreira and Míriam R. García  
 Biosistemas e ingeniería de bioprocesos, IIM-CSIC, Vigo, España  
 nmartinez@iim.csic.es, apedreira@iim.csic.es, miriamr@iim.csic.es

## Resumen

*El morbidostato es un dispositivo de control asistido por ordenador diseñado para estudiar, en tiempo real, la dinámica fenotípica y genotípica de la adaptación y resistencia bacterianas. Dicho sistema incorpora un mecanismo encargado de activar o desactivar el flujo de cierta sustancia antimicrobiana hacia una serie de microreactores, dependiendo de mediciones en línea de la densidad óptica de la población, con el fin de mantener una concentración bacteriana estable en los diferentes cultivos. Así, por medio del componente de control, el morbidostato ejerce una presión constante sobre la selección de las bacterias y su resistencia a la sustancia antimicrobiana que se estudia.*

*La ley de control a integrar en el morbidostato que se propone habitualmente en la literatura consiste en un algoritmo muy básico basado en dos reglas condicionales para determinar cuando se hace necesaria la incorporación de antimicrobiano al sistema. En este trabajo, se muestran dos resultados principales en este contexto: (1) desempeño de simulaciones para la extracción de condiciones bajo las cuales el control del morbidostato no logra estabilizar la población de microorganismos en la concentración objetivo y (2) el control, en tiempo real con estabilización rápida al punto de consigna, de la población bacteriana cuando se aplican técnicas de control predictivo basado en modelo.*

**Palabras clave:** Morbidostato, resistencia bacteriana a antimicrobianos, adaptación bacteriana, control predictivo basado en modelo.

## 1. INTRODUCCIÓN

La evolución adaptativa en laboratorio (EAL) es una aproximación experimental para el estudio a largo plazo de la evolución *in vivo* de una población de microorganismos en condiciones de crecimiento específicas [7]. La EAL fue empleada inicialmente por William Henry Dallinger, quien expuso una población de protozoos a un aumento gradual de la temperatura, logrando que la tolerancia del organismo se incrementase de 23 a 70°C [3]. La EAL no supone una herramienta únicamen-

te para obtener cepas bacterianas con un fenotipo específico, si no que además permite estudiar, desde un punto de vista evolutivo, cómo se desarrollan estos fenotipos a lo largo del tiempo.

Mientras la EAL ha resultado fundamental para entender las adaptaciones inducidas por variables abióticas, como la temperatura, en los últimos tiempos el rápido aumento en el número de bacterias resistentes a los antimicrobianos está siendo el centro de un sinnúmero de estudios. Cuando se analizan los efectos de las sustancias antimicrobianas sobre las bacterias, éstas pueden ser capaces de eliminar (bactericidas) o de inhibir el crecimiento (bacteriostáticas) de la población empleando unas dinámicas de modelado muy características, que todavía generan controversia [2, 18]. Los compuestos que actualmente inducen resistencia en las bacterias no abarcan únicamente los antibióticos, sino muchas otras sustancias tales como los desinfectantes, debido al aumento de su uso (o a su uso inadecuado) durante la pandemia [17, 14, 16].

Para desempeñar la aproximación EAL en presencia de antimicrobianos, los experimentos se realizan clásicamente en cultivo discontinuo, esto es, un matraz con medio nutritivo conteniendo una concentración no letal de antimicrobiano es inoculado con el microorganismo bajo estudio. Tras un periodo de tiempo determinado, el cual dependerá del efecto del antimicrobiano sobre la tasa de crecimiento de la población y de la concentración total de nutrientes, el cultivo alcanza la fase estacionaria. Con el paso de las generaciones, las bacterias de la población van acumulando mutaciones frente a los antimicrobianos, lo que incrementa gradualmente su resistencia a estos compuestos y, en consonancia, su ratio de crecimiento. Dicho de otro modo, se elimina la presión selectiva, fuerza motriz de la evolución. Antes de alcanzar este estado, se toma una alícuota y se transfiere a otro matraz conteniendo una concentración mayor de antimicrobiano. El proceso se repite indefinidamente hasta alcanzar el grado de resistencia deseado o el límite soportado por el microorganismo.

En cultivos discontinuos, sin embargo, la EAL está sometida a la fluctuación incontrolada de las condiciones ambientales con el paso del tiempo. Fac-

tores tan diversos como el nivel de pH, de O<sub>2</sub>, o de nutrientes y metabolitos de desecho, varían considerablemente durante el cultivo, afectando de manera directa a la tasa de crecimiento y a la densidad celular de la población [7, 8]. Estas oscilaciones se muestran más acentuadas durante las transferencias rutinarias de inóculo, tras las cuales la densidad celular disminuye dramáticamente, en varios órdenes de magnitud. En el caso particular de la técnica EAL en presencia de antimicrobianos, las células no solo tienen que hacer frente al factor estresante externo, si no también a los cambios fluctuantes en otras condiciones ambientales. Estas razones impiden mantener la constancia en el nivel de presión selectiva sobre la población.

El morbidostato consiste en un dispositivo de cultivo continuo asistido por computadora capaz de ajustar automáticamente la concentración de antimicrobiano en el medio de cultivo, manteniendo constante la presión selectiva y, por ende, logrando inducir y prologar la fase estacionaria del cultivo a la concentración objetivo de forma indefinida. El morbidostato logra, de este modo, eliminar los problemas derivados de la fluctuación de las condiciones ambientales asociados a los cultivos en régimen discontinuo. La Fig. 1 muestra una ilustración del modo de operación básico de este dispositivo, diseñado inicialmente por Toprak y colaboradores [24] quienes lograron incrementar en varios órdenes de magnitud la resistencia de *Escherichia coli* a diversos antibióticos [23]. Desde entonces, otras versiones del morbidostato han sido propuestas [6, 12, 13], obteniéndose progresivas mejoras en los resultados aportados.

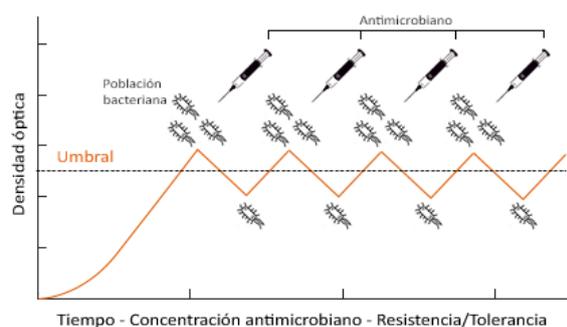


Figura 1: Principio de funcionamiento del morbidostato. Cuando la población bacteriana aumenta por encima del umbral de densidad óptica, el sistema se encarga de inyectar antimicrobiano al medio de cultivo. La subpoblación bacteriana incapaz de tolerar la concentración de antimicrobiano perecerá, y solo aquella fracción con fenotipo favorable logrará perpetuarse. El ciclo se prologa en el tiempo, incrementándose paulatinamente la concentración de antimicrobiano y provocando un aumento en la tolerancia de las bacterias a este compuesto.

## 2. OPERACIÓN ESTÁNDAR EN MORBIDOSTATO

El control que se ejerce en el morbidostato sobre la población bacteriana para lograr una concentración objetivo, punto de consigna o umbral, se viene planteando de manera clásica en la literatura partiendo de la intuición sentada inicialmente por Toprak [23, 24]. Sin embargo, es sencillo comprobar que este procedimiento conlleva ciertos problemas de convergencia al valor consigna.

En este trabajo, reclamamos el estudio de técnicas de control en morbidostato más avanzadas, análogas a las que ya se vienen aplicando en sistemas similares como el quimiostato o el turbidostato [4]. En esta primera sección, tratamos de exponer los principales problemas que plantea la ley de control basada en dos condiciones de Toprak, y mostramos a su vez la mejora que se obtiene al descartar una de las condiciones. Esta ligera modificación, aunque consigue corregir ciertos problemas de convergencia, todavía resulta insuficiente para lograr un control eficiente en el morbidostato.

### 2.1. OPERACIÓN ESTÁNDAR: DOS CONDICIONES SIMPLES PARA ACTIVAR EL ANTIMICROBIANO

Asumiendo la configuración establecida inicialmente por Toprak [24], el sistema que se estudiará en este apartado está compuesto de cuatro microreactores (de volumen  $V$  constante,  $V = 12\text{mL}$ ) donde, para la adición de  $1\text{mL}$  (de nutrientes o de cierta combinación de nutrientes con antimicrobiano) se activa una bomba a velocidad constante durante  $12\text{min}$ . Por tanto, el ratio de dilución en el morbidostato que se describe viene dado por

$$D = \frac{F}{V} = \frac{\Delta V}{\Delta t V} = 0.42\text{h}^{-1},$$

donde  $F$  representa el caudal que atraviesa el sistema (medido en  $\text{mLh}^{-1}$ ), para un incremento de tiempo  $\Delta t = 12/60\text{h}$  y de volumen  $\Delta V = 1\text{mL}$ .

Cuando el volumen que se añade al sistema está compuesto únicamente por nutrientes, y en el caso de alcanzar un exceso de dichos compuestos sin imponer previamente condiciones de sobrepoblación en los microreactores, la concentración de microorganismos  $X(t)$  (en unidades de  $\text{mg L}^{-1}$ ) crece exponencialmente con el tiempo  $t$ , a una velocidad constante  $\mu \geq 0$ . De esta manera, la dinámica resultante para la concentración bacteriana es

$$\frac{dX}{dt}(t) = (\mu - D)X(t).$$

Así, para controlar el desarrollo de la población en los microreactores, se hace necesario igualar

el ratio de dilución a la velocidad de crecimiento ( $\mu = D$ ) o imponer limitaciones en el crecimiento de las bacterias, mediante inhibición de sustrato por ejemplo. Además, cuando el sistema es estable, es posible estimar la velocidad de crecimiento a partir del ratio de dilución. Este es el modo de operación típico del quimiostato, donde no existe retroalimentación y se escoge el ratio de dilución como la variable de control.

El objetivo consiste en controlar adecuadamente la concentración de microorganismos en el morbidostato por medio de la adición de antimicrobiano, para que la población mantenga un valor constante prefijado al sobrepasar cierto límite o umbral. Aunque la configuración original en [24] emplea dos depósitos con diluciones distintas de antimicrobiano, con el fin de ilustrar las ideas de control en morbidostato que se estudian aquí se simplifica el sistema para que la concentración del antimicrobiano añadido sea siempre la misma.

Para ello, partiendo de un instante inicial  $t(1)$ , se hace necesario tomar medidas en  $n$  tiempos discretos  $t(k+1) = t(k) + \Delta t$  ( $1 \leq k \leq n-1$ ) separados por intervalos de amplitud  $\Delta t$  (equivalente al tiempo necesario para añadir 1mL de volumen a los microreactores, y que viene determinado por la velocidad de las bombas) de la densidad óptica de la población ( $OD$ , por sus siglas en inglés). De esta forma, se obtiene un vector de  $n$  mediciones,  $y = [OD(1), \dots, OD(k), \dots, OD(n)]$ , donde  $OD(k)$  representa el valor de la densidad óptica en tiempo  $t(k)$ ,  $1 \leq k \leq n$ . Cabe mencionar que, aunque el morbidostato permite tomar medidas a intervalos de tiempo más reducidos, éstas no se utilizan para mejorar la operación del sistema, si no únicamente para la visualización de resultados.

El control propuesto en [24] consiste en comprobar, a cada tiempo  $t(k)$  ( $1 \leq k \leq n$ ), si se deben añadir tan sólo nutrientes, activando las bombas de un depósito que almacena solo dicho compuesto, o bien una combinación de nutrientes y antimicrobiano, para lo que se deben activan las bombas de un depósito alternativo donde, además de nutrientes, existe una concentración de antimicrobiano igual a  $A_{in}$ . Por simplicidad, se escoge una variable de control  $u(t)$  que toma valor cero si la acción a desempeñar en el siguiente intervalo de tiempo consiste en añadir nutrientes, y valor uno si se añaden nutrientes y antimicrobianos. Esta variable de control  $u(t)$  se debe activar, según Toprak [23], si se dan las siguientes dos condiciones

- 1) La densidad óptica  $OD(k)$  sobrepasa la consigna deseada  $OD^*$ , para algún tiempo  $t(k)$ .
- 2) La velocidad de crecimiento  $\mu$  del microorganismo es positiva,  $\mu > 0$ .

En el trabajo de Toprak [24] no se explica detalladamente el método para el cálculo de la velocidad de crecimiento  $\mu$ , más allá de comentar que en el proceso se emplean valores de  $OD$  en el intervalo  $\Delta t$ , no quedando claro si usa diferencias regresivas

$$\bar{\mu} = \frac{OD(k) - OD(k-1)}{\Delta t},$$

o medidas ajustadas a una exponencial dentro de intervalos de amplitud  $\Delta t$ .

Por el momento, no tendremos en cuenta posibles errores en las mediciones ni la estocasticidad inherente al sistema, por lo que se puede ver que las condiciones 1) y 2) son, en este caso, equivalentes a formular el siguiente control

$$u(t) = \begin{cases} 1, & \text{si } OD(k) > OD^* \text{ y} \\ & OD(k) > OD(k-1), \end{cases} \quad (1)$$

si  $t \in [t(k), t(k+1)]$ , con  $1 \leq k \leq n-1$ .

Para analizar el comportamiento del control (1) basado en las dos condiciones simples 1) y 2), asumimos que la evolución del sistema real con el tiempo obedece a la dinámica

$$\frac{dX}{dt}(t) = \left( \frac{\mu}{1 + A(t)} - D \right) X(t), \quad (2)$$

$$\frac{dA}{dt}(t) = D(u(t)A_{in} - A(t)), \quad (3)$$

$$OD(t) = X(t). \quad (4)$$

La Eq. (2) describe el crecimiento en la población bacteriana  $X(t)$ , que se encuentra ahora inhibido por los efectos de la concentración  $A(t)$  de antimicrobiano (medida en  $\text{mg L}^{-1}$ ) presente en el sistema para cada tiempo  $t$ , y que actúa únicamente con efecto bacteriostático según el modelo planteado en [1]. La dinámica del antimicrobiano también se tiene en cuenta en el modelo a través de la Eq. (3), actuando la variable de control  $u(t)$  como fuente de activación para la adición o supresión de dicho compuesto. Por último, el modelo recoge mediante la Eq. (4) la evolución con el tiempo en el valor de densidad óptica para la población bacteriana, que consideraremos equivalente, en este caso, a la concentración  $X(t)$ . En realidad, la obtención de una función adecuada para describir  $OD(t)$  en aplicaciones reales no resulta una tarea trivial [22], pero para ilustrar las ideas principales de este estudio es suficiente con considerar que el estado  $X(t)$  y la medida  $OD(t)$  coinciden.

En la Fig. 2 se muestran los resultados que se obtienen para el modelo recogido en las ecuaciones (2)–(3)–(4), donde se puede observar que la señal (la concentración  $X(t)$ , en  $\text{mg L}^{-1}$ , de bacterias)

diverge de la consigna con el paso tiempo. Inmediatamente después de que el tamaño de la población alcance el valor consigna  $OD^*$ , dado que la pendiente de crecimiento es elevada, la variable de control (1) se encarga de activar la adición de antimicrobiano al sistema. Sin embargo, la concentración del compuesto inyectado inicialmente en el sistema no resulta suficiente para controlar el rápido crecimiento de la población y así reducir la concentración bacteriana hasta la consigna, llegando a superarse notablemente este valor a las 2h, aproximadamente. Cuando, finalmente, la cantidad de antimicrobiano presente en el sistema es lo bastante elevada como para producir decrecimiento en la población (pasadas más de 3h), el control (1) se encarga de desactivar la adición del compuesto, de manera que las bacterias pueden proliferar nuevamente tras 7h de simulación.

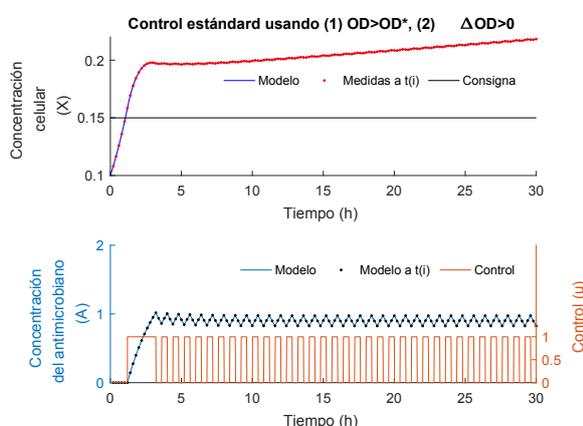


Figura 2: Resultados para el control en morbidostato aplicando las condiciones en [24]. En la gráfica superior se presenta la evolución de la población bacteriana  $X(t)$  obtenida con las Eqs. (2)–(3) ( $\mu = 0.8h^{-1}$ ,  $D = 0.42h^{-1}$ ,  $OD^* = 0.15mg L^{-1}$ ,  $\Delta t = 0.2h$ ,  $A_{in} = 1.8mg L^{-1}$ ), y las medidas (4). En la gráfica inferior se representa la evolución de la concentración de antimicrobiano  $A(t)$ , junto con su activación/desactivación a través del control (1).

De esta forma, para antimicrobianos cuyos efectos son débiles (como los de tipo bacteriostático) puede existir una diferencia substancial entre el valor de estabilización final de la población y la consigna prefijado. Además, cada perturbación que eleve más la concentración provocará mayores desviaciones en este comportamiento.

## 2.2. MODIFICACIÓN DE LA OPERACIÓN ESTÁNDAR: SOLO CONDICIÓN DE UMBRAL

Una manera sencilla de corregir el control del morbidostato planteado en la Eq. (1) para conseguir estabilizar la concentración bacteriana hasta su

valor consigna, consiste en eliminar la condición 2) impuesta en la sección anterior (crecimiento bacteriano positivo) para la activación del antimicrobiano, de manera que el nuevo control a implementar sería

$$u(t) = \begin{cases} 1, & \text{si } OD(k) > OD^*, \\ 0, & \text{en otro caso.} \end{cases} \quad (5)$$

para  $t \in [t(k), t(k + 1)]$ , con  $1 \leq k \leq n - 1$ .

En la Fig. 3 se muestran los resultados obtenidos como solución del modelo (2)–(3)–(4) para el control basado en condición umbral (5). En dicha figura (parte superior) se puede ver como, en el caso de integrar solo la condición de consigna para la activación del flujo de antimicrobiano hacia el sistema, al principio (durante las primeras 6h) se consigue conducir a la población rápidamente hacia el valor deseado. Sin embargo, cuando la concentración alcanza la consigna ( $t = 6.62h$ ) y desciende por debajo de este umbral, el control (5) suprime la inoculación de antimicrobiano al sistema, por lo que la población es libre de proliferar de nuevo. Este ciclo de adición/supresión de antimicrobiano se repite a medida que la concentración bacteriana asciende/desciende el valor consigna, por lo que el sistema no alcanza un equilibrio estable y la población bacteriana entra en un estado de oscilación en torno al umbral deseado.

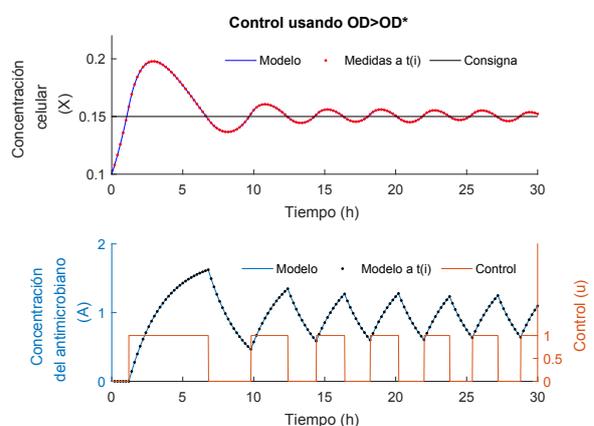


Figura 3: Resultados para el control en morbidostato empleando únicamente la condición umbral. En la gráfica superior se presenta la evolución de la población bacteriana  $X(t)$  obtenida con las Eqs. (2)–(3) ( $\mu = 0.8h^{-1}$ ,  $D = 0.42h^{-1}$ ,  $OD^* = 0.15mg L^{-1}$ ,  $\Delta t = 0.2h$ ,  $A_{in} = 1.8mg L^{-1}$ ), junto con las medidas (4). En la gráfica de la parte inferior se representa la evolución de la concentración de antimicrobiano  $A(t)$  en el sistema, junto con su activación/desactivación a través del control (5).

### 3. CONTROL PREDICTIVO BASADO EN MODELOS

El notable éxito de la técnica de control predictivo basado en modelos (MPC, por sus siglas en inglés) en aplicaciones industriales en los setenta [20] provocó la rápida expansión de esta tecnología de control por toda la industria [19]. Los beneficios del MPC son diversos, entre los que destaca la gran flexibilidad en la formulación del problema de optimización, lo que permite que el sistema adopte perfiles variables complicados incluso cuando existen discrepancias entre el modelo dinámico utilizado y el sistema real (o planta) que se modela. Aunque el MPC viene siendo ampliamente utilizado para el tratamiento de modelos lineales, ha demostrado también su utilidad para estudiar sistemas dinámicos multivariables no lineales [5].

Aunque el uso de MPC es común en procesos industriales, los ejemplos de su aplicación en sistemas de co-cultivo de microorganismos en microreactores, similares al morbidostato, todavía son escasos. En particular, destacamos un trabajo reciente de implementación de MPC para la estabilización de la temperatura y la densidad óptica en el sistema de bajo coste Chi.Bio [21]. No obstante, la práctica más frecuente en la literatura todavía consiste en aplicar leyes de control muy simples, similares a la que se plantean en [23].

Al aplicar MPC en el caso del morbidostato, es importante notar que la flexibilidad en el control se ve muy limitada por la configuración establecida en [24], que es el marco adoptado en este trabajo para poder llevar a cabo una comparación equilibrada. No debemos olvidar, sin embargo, que el uso de MPC abre la posibilidad a la aplicación de controles mucho más flexibles, y con objetivos que pueden ir desde la búsqueda de perfiles variables de concentración, hasta la maximización de selección de la resistencia en poblaciones bacterianas (en el caso de que la dinámica de las cepas resistentes esté incluida en el modelo).

Para el cálculo de los controles óptimos que permitan estabilizar la población bacteriana al valor consigna en el caso que nos ocupa, planteamos el siguiente problema de optimización

$$\min_{u(k), u(k+1)} J = \int_{t(k)}^{t(k)+2\Delta t} (X(t) - OD^*)^2 dt,$$

s.a:

$$\begin{cases} \frac{dX}{dt}(t) = \left( \frac{\mu}{1 + A(t)} - D \right) X(t), \\ \frac{dA}{dt}(t) = D(u(t)A_{in} - A(t)), \\ u(k), u(k + 1) \in \{0, 1\}, \end{cases} \quad (6)$$

donde el horizonte de integración es el doble del

intervalo necesario para añadir 1mL de volumen al sistema (es decir,  $t(k) + 2\Delta t$ ), y donde se ha fijado como estado inicial del modelo  $X(t(1)) = OD(1)$ . No incluimos penalización en el control, ya que éste solo puede tomar dos enteros valores distintos. Es importante notar que, tal y como se ha planteado el problema (6), tan sólo existen cuatro posibles valores para el control óptimo, de manera que es sencillo obtener la solución por búsqueda exhaustiva entre las posibles combinaciones. Sin embargo, este proceso puede resultar tedioso cada vez que se decide modificar el horizonte de optimización u otros parámetros del problema, de manera que se ha empleado el algoritmo genético [11] para su resolución, el cual permite operar con variables de decisión enteras.

En la Fig. 4 se muestran los resultados obtenidos como solución del modelo (2)–(3)–(4) aplicando el control óptimo obtenido como solución del problema de minimización (6), y cuyo perfil se representa en la parte inferior de la figura. En el gráfico de la parte superior de la figura, se puede observar como la combinación de los periodos de adición y supresión de antimicrobiano que ejerce el control obtenido sobre el cultivo consigue que la concentración de bacterias dentro del microreactor converja a la consigna rápidamente.

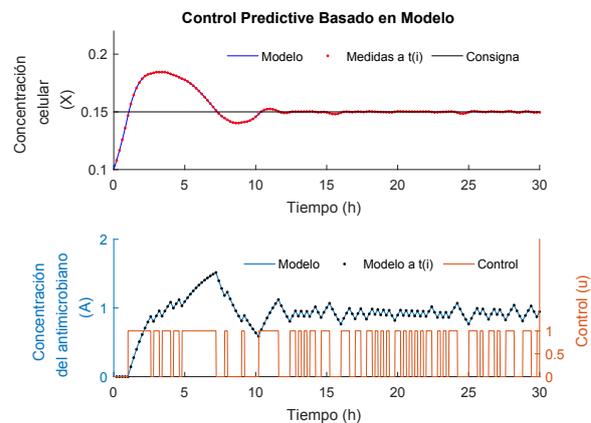


Figura 4: Resultados para el control en morbidostato empleando MPC sin discrepancias entre la velocidad de crecimiento en modelo y las dinámicas reales. En la gráfica de la parte superior se representa la evolución de la población bacteriana  $X(t)$  obtenida con las Eqs. (2)–(3) ( $\mu = 0.8h^{-1}$ ,  $D = 0.42h^{-1}$ ,  $OD^* = 0.15mg L^{-1}$ ,  $\Delta t = 0.2h$ ,  $A_{in} = 1.8mg L^{-1}$ ), y las mediciones (4). En la gráfica inferior se representa la evolución de la concentración de antimicrobiano  $A(t)$  en el sistema, junto con su activación/desactivación a través del control óptimo obtenido como solución de (6).

Actualmente, es bien conocido que los modelos deterministas de crecimiento bacteriano son aproxi-

maciones bastante simplistas de la realidad, estando el comportamiento de las poblaciones reales sujeto a diversos factores (ambientales, entre otros) altamente variables. Hasta el momento, el mecanismo de control analizado en este trabajo considera que modelo y realidad obedecen la misma dinámica, de manera que las mediciones dadas por la Eq. (4) se suponían exactas.

Para analizar qué sucede en caso contrario, consideramos ahora que la velocidad de crecimiento  $\mu$  del sistema real fluctúa en torno a un valor medio  $\bar{\mu}$  de la forma  $\mu = \bar{\mu} + \mathcal{N}(0, \sigma^2)$ , es decir, siguiendo una distribución normal con desviación estándar  $\sigma$ . Corregimos así las mediciones de densidad óptica del sistema real (4) e introducimos los nuevos valores en el problema de optimización (6), de manera que el control óptimo obtenido aplicando MPC y el comportamiento de la población en este caso pueden verse en la Fig. 5.

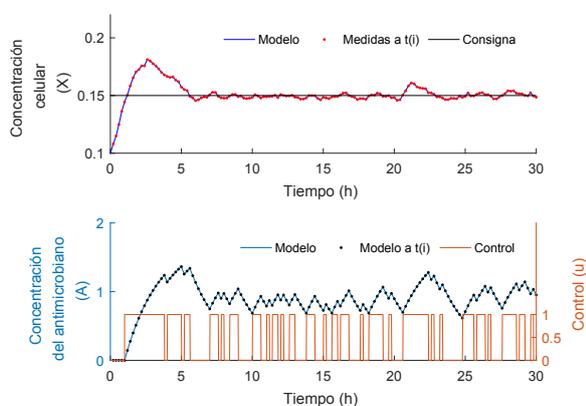


Figura 5: Resultados para el control en morbidostato empleando MPC con discrepancias entre la velocidad de crecimiento en modelo y la dinámica real. En la gráfica superior se presenta la evolución de la población bacteriana  $X(t)$  obtenida con las Eqs. (2)–(3) ( $\mu = 0.8h^{-1}$ ,  $D = 0.42h^{-1}$ ,  $OD^* = 0.15mg L^{-1}$ ,  $\Delta t = 0.2h$ ,  $A_{in} = 1.8mg L^{-1}$ ), frente a las mediciones (4) corregidas según la distribución normal ( $\bar{\mu} = 0.8h^{-1}$ ,  $\sigma = 0.1h^{-1}$ ). En la gráfica inferior se representa la evolución de la concentración de antimicrobiano  $A(t)$  en el sistema, junto con su activación/desactivación a través del control óptimo obtenido como solución de (6) al aplicar fluctuación en las mediciones.

Cabe señalar que los buenos resultados de convergencia que se muestran en la Fig. 5, obtenidos cuando hay discrepancias entre el modelo y el sistema real, se deben a que las fluctuaciones de las mediciones se han escogido normalmente distribuidas con media cero. No obstante, cuando la velocidad del sistema modelo se subestima ( $\bar{\mu} > \mu$ ) cabe la posibilidad de que la concentración bacteriana se establezca en valores que sobrepasen el

umbral prefijado, mientras que si dicha velocidad se sobrestima ( $\mu > \bar{\mu}$ ) la población puede llegar a estabilizarse en valores inferiores a dicho umbral.

En trabajos futuros, se pretende extender el control MPC para incluir actualizaciones del modelo empleando datos del sistema previamente obtenidos, con un planteamiento similar al que se propone en [10]. También se pretende emprender el uso de modelos más realistas que incluyan los efectos del ruido inherente a cualquier sistema real, basados en ecuaciones diferenciales estocásticas por ejemplo, como se propone en [9, 15].

#### 4. CONCLUSIONES

En este trabajo, exponemos como el mecanismo de control propuesto ampliamente en la literatura para su integración en el morbidostato puede resultar en grandes desviaciones entre la concentración bacteriana y la consigna deseada, cuando el antimicrobiano que se estudia actúa con efecto bacteriostático. Para corregir este comportamiento, se plantea una simplificación trivial en el control del morbidostato, que permite eliminar la divergencia de la población del valor consigna prefijado. Sin embargo, la actuación de este mecanismo de control introduce oscilaciones en la concentración bacteriana en torno al umbral impuesto, de manera que la población no llega a alcanzar el equilibrio estable en dicho umbral. Por último, se muestra como el uso de control predictivo basado en modelos (MPC) puede ayudar a resolver esta divergencia en el comportamiento del cultivo, obteniendo buenos resultados. Se discuten además otros problemas adicionales que pueden emerger cuando se establecen discrepancias entre el modelo considerado en las optimizaciones y la evolución real del sistema real que se estudia.

#### Agradecimientos

MRG dedica este trabajo al profesor Antonio A. Alonso. Este línea de investigación nunca podría haberse materializado sin aquella conversación informal donde le comenté, entusiasmada, el potencial que veía en el morbidostato y él me animó, sin ninguna duda, a lanzarme a su construcción.

Tampoco podría ser posible sin la financiación correspondiente: NML agradece a la ayuda del CSIC 20213AT001, AP a la ayuda de la Xunta de Galicia IN606A-2020/028 y MRG a la ayuda RTI2018-093560-J-I00 financiada por MCIN/AEI/10.13039/501100011033.

#### English summary

#### MODEL PREDICTIVE CONTROL (MPC) AS ALTERNATIVE TO

## STANDARD OPERATION IN MORBIDOSTAT

### Abstract

*A morbidostat is a computer-aided control device to study phenotypic and genotypic real-time dynamics of bacteria adaptation and resistance. This system includes a control mechanism to activate or deactivate the inflow of an antimicrobial substance into a series of microreactors, depending on online measurements of the population's optical density, thus maintaining a steady-state bacterial concentration across the different cultures. In other words, the morbidostat actuates through the control component to maintain a constant drug selection pressure sufficient for bacterial adaptation or resistance to the antimicrobial substance under study.*

*The morbidostat control law used so far in the literature consists of a fairly simple algorithm incorporating two conditional rules to determine when the addition of the antimicrobial to the system is necessary. In this work, we show two main results in this context: (1) to carry out simulations and extract conditions under which simple control in morbidostat cannot stabilize the concentration of microorganisms to the target concentration and (2) the real-time control, with stabilization to the target point, of the bacterial concentration using model predictive control.*

**Keywords:** Morbidostat, bacterial antimicrobial resistance, bacterial adaptation, model predictive control.

### Referencias

- [1] E. Berríos-Caro, D. R. Gifford, and T. Galla. Competition delays multi-drug resistance evolution during combination therapy. *Journal of Theoretical Biology*, 509:1–5, 2021.
- [2] J. Coates, B. R. Park, D. Le, E. Şimşek, W. Chaudhry, and M. Kim. Antibiotic-induced population fluctuations and stochastic clearance of bacteria. *eLife*, 7:1–26, 2018.

- [3] W. H. Dallinger. The president's address. *Journal of the Royal Microscopical Society*, 7(2):185–199, 1887.
- [4] H. De Battista, E. Pico-Marco, F. N. Santos-Navarro, and J. Pico. Output Feedback Linearization of Turbidostats after Time Scaling. *IEEE Transactions on Control Systems Technology*, 27(4):1668–1676, 2019.
- [5] A. L. Dontchev. Model Predictive Control. In *Applied Mathematical Sciences (Switzerland)*, volume 205, pages 197–204. Springer, 2021.
- [6] B. Döbelmann, M. Willmann, M. Steglich, B. Bunk, U. Nübel, S. Peter, and R. A. Neher. Rapid and Consistent Evolution of Colistin Resistance in Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* during Morbidostat Culture. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(9), 2017.
- [7] M. Dragosits and D. Mattanovich. Adaptive laboratory evolution principles and applications for biotechnology. *Microbial Cell Factories*, 12(1):64, 2013.
- [8] D. M. Ekkers, F. B. dos Santos, C. A. Mallon, F. Bruggeman, and G. S. van Doorn. The omnistat: A flexible continuous-culture system for prolonged experimental evolution. *Methods in Ecology and Evolution*, 11(8):932–942, 2020.
- [9] M. R. García, J. A. Vázquez, I. G. Teixeira, and A. A. Alonso. Stochastic individual-based modeling of bacterial growth and division using flow cytometry. *Frontiers in Microbiology*, 8(JAN):2626, 1 2018.
- [10] M. R. García, C. Vilas, L. O. Santos, and A. A. Alonso. A robust multi-model predictive controller for distributed parameter systems. *Journal of Process Control*, 22(1):60–71, 2012.
- [11] D. E. Golberg. Genetic algorithms in search, optimization, and machine learning. *Addison Wesley*, 1989(102):36, 1989.
- [12] M. Javed, V. Ueltzhoeffer, M. Heinrich, H. J. Siegrist, R. Wildermuth, F. R. Lorenz, R. A. Neher, and M. Willmann. Colistin susceptibility test evaluation of multiple-resistance-level *Pseudomonas aeruginosa* isolates generated in a morbidostat device. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(12):3368–3374, 2018.
- [13] S. A. Leyn, J. E. Zlamal, O. V. Kurnasov, X. Li, M. Elane, L. Myjak, M. Godzik,

- A. de Crecy, F. Garcia-Alcalde, M. Ebeling, and A. L. Osterman. Experimental evolution in morbidostat reveals converging genomic trajectories on the path to triclosan resistance. *Microbial Genomics*, 7(5), 5 2021.
- [14] T. A. Lobie, A. A. Roba, J. A. Booth, K. I. Kristiansen, A. Aseffa, K. Skarstad, and M. Bjørås. Antimicrobial resistance: A challenge awaiting the post-COVID-19 era. *International Journal of Infectious Diseases*, 111:322–325, 10 2021.
- [15] N. Martínez-López, C. Vilas, and M. R. García. Comparativa entre modelos estocásticos de crecimiento bacteriano a distintas escalas. In *XLII Jornadas de Automática*, pages 442–449. Servizo de Publicacións da UDC, 8 2021.
- [16] N. Nordholt, O. Kanaris, S. B. Schmidt, and F. Schreiber. Persistence against benzalkonium chloride promotes rapid evolution of tolerance during periodic disinfection. *Nature Communications*, 12(1), 2021.
- [17] A. Pedreira, Y. Taşkın, and M. R. García. A Critical Review of Disinfection Processes to Control SARS-CoV-2 Transmission in the Food Industry. *Foods*, 10(2):283, 1 2021.
- [18] A. Pedreira, J. A. Vázquez, and M. R. García. Kinetics of bacterial adaptation, growth and death at didecyldimethylammonium chloride sub-MIC concentrations. *Frontiers in Microbiology*, 13:758237, 2022.
- [19] S. J. Qin and T. A. Badgwell. A survey of industrial model predictive control technology. *Control Engineering Practice*, 11(7):733–764, 7 2003.
- [20] J. Richalet, A. Rault, J. L. Testud, and J. Papon. Model predictive heuristic control. Applications to industrial processes. *Automatica*, 14(5):413–428, 9 1978.
- [21] H. Steel, R. Habgood, C. Kelly, and A. Papanichristodoulou. In situ characterisation and manipulation of biological systems with Chi.Bio. *PLoS Biology*, 18(7):e3000794, 7 2020.
- [22] K. Stevenson, A. F. McVey, I. B. Clark, P. S. Swain, and T. Pilizota. General calibration of microbial growth in microplate readers. *Scientific Reports*, 6(1):1–7, 12 2016.
- [23] E. Toprak, A. Veres, J.-B. Michel, R. Chait, D. L. Hartl, and R. Kishony. Evolutionary paths to antibiotic resistance under dynamically sustained drug selection. *Nature Genetics*, 44(1):101–105, 2011.
- [24] E. Toprak, A. Veres, S. Yildiz, J. M. Pedraza, R. Chait, J. Paulsson, and R. Kishony. Building a morbidostat: An automated continuous-culture device for studying bacterial drug resistance under dynamically sustained drug inhibition. *Nature Protocols*, 8(3):555–567, 2 2013.



© 2022 by the authors.  
Submitted for possible  
open access publication  
under the terms and conditions of the Creative  
Commons Attribution CC-BY-NC 4.0 license  
(<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>).