

1. La función `-fast_mergepairs` cumple la función de crear secuencias en consenso entre las secuencias forward y reverse

```
# 1. Ensamblaje de las secuencias de forward (R1) y reverse (R2) #

usearch11 -fastq_mergepairs H01_R1.fastq H02_R1.fastq H03_R1.fastq
H04_R1.fastq H05_R1.fastq H06_R1.fastq H07_R1.fastq H08_R1.fastq
H09_R1.fastq H10_R1.fastq H11_R1.fastq H12_R1.fastq H13_R1.fastq H14_R1.fastq
H15_R1.fastq H16_R1.fastq H17_R1.fastq H18_R1.fastq H19_R1.fastq H20_R1.fastq
H21_R1.fastq H22_R1.fastq H23_R1.fastq H24_R1.fastq H25_R1.fastq H26_R1.fastq
H27_R1.fastq H28_R1.fastq H29_R1.fastq H30_R1.fastq H31_R1.fastq H32_R1.fastq
H33_R1.fastq H34_R1.fastq H35_R1.fastq H36_R1.fastq H37_R1.fastq H38_R1.fastq
H39_R1.fastq H40_R1.fastq H41_R1.fastq H42_R1.fastq H43_R1.fastq H44_R1.fastq
H45_R1.fastq H46_R1.fastq H47_R1.fastq H48_R1.fastq H49_R1.fastq H50_R1.fastq
H51_R1.fastq H52_R1.fastq H53_R1.fastq H54_R1.fastq H55_R1.fastq H56_R1.fastq
H57_R1.fastq H58_R1.fastq H59_R1.fastq H60_R1.fastq H61_R1.fastq H62_R1.fastq
H63_R1.fastq H64_R1.fastq -reverse H01_R2.fastq H02_R2.fastq H03_R2.fastq
H04_R2.fastq H05_R2.fastq H06_R2.fastq H07_R2.fastq H08_R2.fastq H09_R2.fastq
H10_R2.fastq H11_R2.fastq H12_R2.fastq H13_R2.fastq H14_R2.fastq H15_R2.fastq
H16_R2.fastq H17_R2.fastq H18_R2.fastq H19_R2.fastq H20_R2.fastq H21_R2.fastq
H22_R2.fastq H23_R2.fastq H24_R2.fastq H25_R2.fastq H26_R2.fastq H27_R2.fastq
H28_R2.fastq H29_R2.fastq H30_R2.fastq H31_R2.fastq H32_R2.fastq H33_R2.fastq
H34_R2.fastq H35_R2.fastq H36_R2.fastq H37_R2.fastq H38_R2.fastq H39_R2.fastq
H40_R2.fastq H41_R2.fastq H42_R2.fastq H43_R2.fastq H44_R2.fastq H45_R2.fastq
H46_R2.fastq H47_R2.fastq H48_R2.fastq H49_R2.fastq H50_R2.fastq H51_R2.fastq
H52_R2.fastq H53_R2.fastq H54_R2.fastq H55_R2.fastq H56_R2.fastq H57_R2.fastq
H58_R2.fastq H59_R2.fastq H60_R2.fastq H61_R2.fastq H62_R2.fastq H63_R2.fastq
H64_R2.fastq
-fastq_maxdiffs 6 -fastq_pctid 90 -relabel @ -fastqout merged_phoD.fq
```

2. Eliminación de los primers de las secuencias

```
# 2. Cortado de los primeros en los extremos forward y reverse #

usearch11 -fastx_truncate merged_phoD.fq -stripleft 20 -stripriht 20 -
fastqout stripped_phoD.fq
```

3. La función `-fastq_eestats2` genera un resumen de cuantas lecturas superan una prueba de error esperado a diferentes longitudes de pares de bases. La importancia de esta función es la de determinar parámetros que se emplearan en funciones posteriores

```
# 3. Detección de la cantidad de lecturas que pasan un filtro de error
esperado en diferentes longitudes de pares de bases #

usearch11 -fastq_eestats2 stripped_phoD.fq -output eestats_phoD.txt -
length_cutoffs 200,300,10
```

4. La función `-fastq_filter` realiza un filtro de calidad y una conversión de formato de `.fq` a `.fa`

```
# 4. Purga de calidad a una longitud de bases optima de la secuencia y
conversión a .fa #

usearch11 -fastq_filter stripped_phoD.fq -fastq_maxee 1.0 -fastq_truncle
n 290 -relabel Filt -fastaout reads_phoD.fa
```

5. Se utiliza la función `-fastx_uniques` para determinar las lecturas únicas y su abundancia mediante dereplicación

```
# 5. Determinación de las lecturas únicas y de su abundancia #

usearch11 -fastx_uniques reads_phoD.fa -sizeout -relabel Uniq -fastaout
uniques_phoD.fa
```

6. Aplicación del algoritmo UNOISE para eliminar el ruido generado por la lectura de los amplicones y determinar los ZOTUs detectados

```
# 6. Aplicar el algoritmo UNOISE para determinar las secuencias sin ruido
(ZOTUs) #

usearch11 -unoise3 uniques_phoD.fa -zotus zotus_phoD.fa
```

7. Generación de una matriz de datos que contiene la cantidad de veces (Abundancia beta) que se leyeron los OTUs en las secuencias analizadas

```
# 7. Generar la tabla de datos de OTUs #

usearch11 -otutab merged_phoD.fq -otus zotus_phoD.fa -otutabout
otutab_raw_phoD.txt
```

8. Generación de una tabla resumen de estadísticos de los OTUs, como la cantidad de OTUs, el número de muestras, etc.

```
# 8. Generación de la tabla de estadísticos de los OTUs

usearch11 -otutab_stats otutab_raw_phoD.txt -output otutab_stats.txt
```

9. Rarefacción de la tabla de OTUs a un número fijo de lecturas por muestra para mantener la forma de la distribución de la abundancia en cada muestra

```
# 9. Rarefacción de la tabla de OTUs #
```

```
usearch11 -otutab_rare otutab_raw_phoD.txt -sample_size 5000 -output  
otutab_phoD.txt
```

10. Cálculo de índices de diversidad alfa a partir de la tabla de OTUs

```
# 10. Determinación de la diversidad alfa #
```

```
usearch11 -alpha_div otutab_phoD.txt -output alpha_diversity_phoD.txt
```

11. Aplicando la función `-ublast` se compara la tabla de ZOTUs con la base datos del gen *phoD* “phoD_db.udb” sobre secuencias asociadas a ZOTUs.

```
# 11. Búsqueda basada en una base de datos mediante el algoritmo UBLAST #
```

```
usearch11 -ublast zotus_phoD.fa -db phoD_db.udb -evaluate 1e-8 -accel 0.9 -  
top_hit_only -blast6out results_phoD.txt
```