

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 FEL279_R1.fq FEL280_R1.fq FEL281_R1.fq  
FEL282_R1.fq FEL283_R1.fq FEL284_R1.fq FEL285_R1.fq FEL286_R1.fq FEL287_R1.fq  
FEL288_R1.fq FEL289_R1.fq FEL290_R1.fq FEL291_R1.fq FEL292_R1.fq FEL293_R1.fq  
FEL294_R1.fq FEL295_R1.fq FEL296_R1.fq FEL297_R1.fq FEL298_R1.fq FEL299_R1.fq  
FEL300_R1.fq FEL301_R1.fq FEL302_R1.fq FEL303_R1.fq FEL304_R1.fq FEL305_R1.fq  
FEL306_R1.fq FEL307_R1.fq FEL308_R1.fq FEL309_R1.fq FEL310_R1.fq FEL311_R1.fq  
FEL312_R1.fq FEL313_R1.fq FEL314_R1.fq FEL315_R1.fq FEL316_R1.fq FEL317_R1.fq  
FEL318_R1.fq FEL319_R1.fq FEL320_R1.fq FEL321_R1.fq FEL322_R1.fq FEL323_R1.fq  
FEL324_R1.fq FEL325_R1.fq FEL326_R1.fq FEL327_R1.fq FEL328_R1.fq FEL329_R1.fq  
FEL330_R1.fq FEL331_R1.fq FEL332_R1.fq FEL333_R1.fq FEL334_R1.fq FEL335_R1.fq  
FEL336_R1.fq FEL337_R1.fq FEL338_R1.fq FEL339_R1.fq FEL340_R1.fq FEL341_R1.fq  
FEL342_R1.fq -reverse FEL279_R2.fq FEL280_R2.fq FEL281_R2.fq FEL282_R2.fq  
FEL283_R2.fq FEL284_R2.fq FEL285_R2.fq FEL286_R2.fq FEL287_R2.fq FEL288_R2.fq  
FEL289_R2.fq FEL290_R2.fq FEL291_R2.fq FEL292_R2.fq FEL293_R2.fq FEL294_R2.fq  
FEL295_R2.fq FEL296_R2.fq FEL297_R2.fq FEL298_R2.fq FEL299_R2.fq FEL300_R2.fq  
FEL301_R2.fq FEL302_R2.fq FEL303_R2.fq FEL304_R2.fq FEL305_R2.fq FEL306_R2.fq  
FEL307_R2.fq FEL308_R2.fq FEL309_R2.fq FEL310_R2.fq FEL311_R2.fq FEL312_R2.fq  
FEL313_R2.fq FEL314_R2.fq FEL315_R2.fq FEL316_R2.fq FEL317_R2.fq FEL318_R2.fq  
FEL319_R2.fq FEL320_R2.fq FEL321_R2.fq FEL322_R2.fq FEL323_R2.fq FEL324_R2.fq  
FEL325_R2.fq FEL326_R2.fq FEL327_R2.fq FEL328_R2.fq FEL329_R2.fq FEL330_R2.fq  
FEL331_R2.fq FEL332_R2.fq FEL333_R2.fq FEL334_R2.fq FEL335_R2.fq FEL336_R2.fq  
FEL337_R2.fq FEL338_R2.fq FEL339_R2.fq FEL340_R2.fq FEL341_R2.fq FEL342_R2.fq  
-relabel @ -fastq_maxdiffs 6 -fastq_pctid 90 -fastqout merged.fq
```

2. 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

```
# 2. Detección de la cantidad de lecturas que pasan un filtro de error  
esperado en diferentes longitudes de pares de bases #  
  
usearch11 -fastq_eestats2 merged.fq -output eestats_phoD.txt -  
length_cutoffs 200,300,10
```

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

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

usearch11 -fastq_filter merged.fq -fastq_maxee 1.0 -fastq_trunclen 290 -
relabel Filt -fastaout reads.fa
```

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

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

usearch11 -fastx_uniques reads.fa -sizeout -relabel Uniq -fastaout
uniques.fa
```

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

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

usearch11.exe -unoise3 uniques.fa -zotus zotus.fa
```

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

```
# 6. Generar tabla de datos de OTUs #

usearch11 -otutab merged.fq -otus zotus.fa -otutabout otutab_raw.txt
```

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

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

usearch11 -otutab_stats otutab_raw.txt -output otutab_stats.txt
```

8. 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

```
# 8. Rarefacción de la tabla de OTUs #  
  
usearch11 -otutab_rare otutab_raw.txt -sample_size 4163 -output otutab.txt
```

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

```
# 9. Determinación de la diversidad alfa #  
  
usearch11 -alpha_div otutab.txt -output alpha_diversity.txt
```

10. Mediante la función `-sintax` se aplica el algoritmo SINTAX, prediciendo las secuencias del archivo de entrada tras ser comparado con una base de datos de referencia, en este caso siendo el documento “`utax_reference_dataset_29.11.2022.fasta`”.

Posteriormente, se utiliza la función `-sintax_summary` para realizar tablas resumen del nivel jerárquico de taxonomía de interés (Filo, Clase, etc.).

```
#10. Predicción de la taxonomía mediante el algoritmo SINTAX #  
  
usearch11 -sintax zotus.fa -db rdp_16s_18v.fa -strand both -sintax_cutoff  
0.5 -tabbedout sintax.txt  
  
usearch11 -sintax_summary sintax.txt -otutabin otutab.txt -rank p -output  
phylum_summary.txt  
usearch11 -sintax_summary sintax.txt -otutabin otutab.txt -rank c -output  
class_summary.txt  
usearch11 -sintax_summary sintax.txt -otutabin otutab.txt -rank g -output  
genus_summary.txt
```