



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Biologia da Conservação

Dissertação

**Estudo dos efeitos de alterações climáticas nas interações
bióticas em ambientes aquáticos**

Sara Pacheco Ribeiro

Orientador(es) | Miguel Nunes da Costa da Graça Matias

Carla Pinto Cruz

Évora 2020





Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Biologia da Conservação

Dissertação

**Estudo dos efeitos de alterações climáticas nas interações
bióticas em ambientes aquáticos**

Sara Pacheco Ribeiro

Orientador(es) | Miguel Nunes da Costa da Graça Matias
Carla Pinto Cruz

Évora 2020



A dissertação foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Escola de Ciências e Tecnologia:

- Presidente | Paulo Sá Sousa (Universidade de Évora)
- Vogal | Diogo Figueiredo (Universidade de Évora)
- Vogal-orientador | Miguel Nunes da Costa da Graça Matias (Universidade de Évora)

Índice

Agradecimentos.....	1
Abstract.....	2
Resumo	3
Índice de figuras	4
Índice de tabelas	6
1. Introdução	7
1.1. Contexto	7
1.2. Interações bióticas.....	10
1.3. Estado da arte	12
1.4. Estudo.....	13
1.4.1. Objetivos e hipóteses	16
2. Metodologia.....	17
2.1. Instalação experimental Iberian Ponds	17
2.2. Áreas de estudo.....	18
2.3. Caracterização de comunidades aquáticas.....	18
2.4. Determinação de estrutura de tamanhos e identificação de potenciais predadores e presas	19
2.5. Estudo preliminar de viabilidade do sistema experimental (estudo-piloto)	21
2.6. Ensaio de predação.....	24
2.7. Análise estatística	33
3. Resultados	35
3.1. Ajuste de modelos.....	35
3.2. Ajuste de equações	37
3.3. Ajuste logístico de dados e obtenção de gráficos.....	39
3.4. Ajuste ecológico de dados e comparação de polígonos	41
4. Discussão	43
5. Limitações e direções futuras	52
6. Considerações finais	55
7. Referências	57
8. Anexos.....	64
8.1. Anexo I	64
8.2. Anexo II	67
8.3. Anexo III	68

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao meu orientador, o Doutor Miguel Matias, e à minha coorientadora, a Professora Doutora Carla Pinto-Cruz. Agradecer por inúmeros motivos, mas principalmente pela oportunidade, disponibilidade, esclarecimento de dúvidas e transmissão de conhecimento.

Subsequentemente, queria agradecer aos professores da Licenciatura em Biologia e do Mestrado em Biologia da Conservação da Universidade de Évora, com destaque para os professores João Rabaça, Paulo Sá-Sousa e Helena Adão pela ajuda prestada na estruturação inicial da dissertação e pelo fornecimento de ferramentas que nos capacitam tanto a nível académico como profissional.

Ao projeto TrophicResponse (PTDC/BIA-BIC/0352/2014) por possibilitar a concretização da dissertação.

A todas as pessoas que colaboram no projeto, com as quais tive o prazer de trabalhar durante este ano, no laboratório e no campo, por todos os momentos de generosidade, aprendizagem e diversão que dificilmente esquecerei. Nomeadamente, à Cátia Lúcio Pereira por todo o exemplo, disponibilidade, apoio e partilha, com a qual me identifico muito. Ao Andreu Castillo-Escrivà pela ajuda que me deu ao longo de todas as experiências e orientação em laboratório. À Katarzyna Sroczyńska por todos os ensinamentos em identificação de macroinvertebrados.

Aos colegas e amigos de Licenciatura e de Mestrado por todo o companheirismo, em especial à Cristina Parreira, Vanessa Guerra e Stefan Duarte. E ainda, às amigas de longa data de quem tenho muitas saudades e prometo recompensar.

Posteriormente, a toda a minha família que sempre me acompanha e apoia incondicionalmente, em particular aos meus pais, irmãos, avós e tios, nunca saberei como retribuir. Um agradecimento especial à minha raposinha, como gosto carinhosamente de lhe chamar, por tudo. Ao meu namorado Hugo e à minha gatinha Noah por todos os momentos de carinho, partilha e felicidade ao longo de todos estes anos. Por fim, queria dizer que foi um ano repleto de desafios, mas Tu, Paizinho, ajudaste-me a superá-los, uma vez mais.

Study of the effects of climate change on biotic interactions in aquatic environments

Abstract

Climate change is currently one of the major environmental changes that dramatically affect life on Earth. A key gap in knowledge is how environmental change modifies species interactions and its consequences. The present dissertation reports a study on how predator-prey interactions in aquatic systems change across different sites in the Iberian Peninsula. The different interaction pairs were tested under two different temperatures at six locations through a heating system. The results showed that the functional responses at ambient temperature are significant, in which the prey consumption rates were dependent of prey density in all sites, increasing with higher density levels. The opposite was verified in half of the sites under induced temperature. Understanding how ecosystems respond to current and future climatic changes is essential to provide the basis for conservation measures that ensure the long-term persistence of biodiversity.

Keywords: Body-size, Functional response, Macroinvertebrates, Mesocosms, Predator-prey interactions, Warming.

Estudo dos efeitos de alterações climáticas nas interações bióticas em ambientes aquáticos

Resumo

As alterações climáticas são atualmente uma das principais alterações ambientais que afeta drasticamente a vida na Terra. Há ainda lacunas de conhecimento no modo como o aquecimento afeta as interações bióticas. A presente dissertação versa sobre as mudanças nas interações predador-presa em sistemas aquáticos em diferentes regiões da Península Ibérica. Diferentes pares de interação foram testados a duas temperaturas em seis locais distintos, recorrendo a um sistema de aquecimento. Os resultados mostraram que as respostas funcionais são significativas sob temperatura ambiente, na qual as taxas de consumo de presas foram dependentes da densidade das mesmas em todos os locais, aumentando com níveis de densidade superiores. O contrário foi verificado em metade dos locais sob temperatura induzida. Compreender como os ecossistemas naturais respondem às alterações climáticas atuais e futuras é essencial para fornecer a base para medidas de conservação que assegurem a persistência da biodiversidade a longo prazo.

Palavras-chave: Aquecimento, Interações predador-presa, Macroinvertebrados, Mesocosmos, Resposta funcional, Tamanho corporal.

Índice de figuras

Figura 1 - Gráfico de resposta funcional (curvas de tipo I, II e III) segundo Holling	12
Figura 2 - Representação dos potenciais predadores presentes nas áreas de estudo, distribuídos na coluna de água de um mesocosmo	14
Figura 3 - Distribuição dos mesocosmos nos diferentes locais da Península Ibérica, de acordo com o gradiente térmico	17
Figura 4 - Microscópio estereoscópico utilizado para fotografar e identificar macroinvertebrados	20
Figura 5 - Potenciais predadores (círculos) e presas (triângulos) utilizados nas experiências, representados de forma abreviada, segundo a respetiva biomassa individual e abundância por mesocosmo. As cores estão de acordo com o gradiente térmico dos seis locais: Múrcia (vermelho escuro), Toledo (vermelho), Évora (amarelo), Porto (azul claro), Jaca (azul ciano) e Peñalara (azul escuro)	21
Figura 6 - Taxa de consumo de presas em função das densidades 10, 20, 40 e 80 do 4º ensaio do estudo-piloto	23
Figura 7 - Sistema de aquecimento utilizado para a experiência de predação (a) e termostatos utilizados para registo da temperatura ambiente (b) e induzida (c) - fotografias da experiência em Évora	26
Figura 8 - Predadores isolados durante 42 h com mistura oxigenada de água filtrada e canalizada - fotografia da experiência em Jaca.....	27
Figura 9 - Esquema representativo do desenho experimental com dois tabuleiros para predação sob temperatura ambiente média e um tabuleiro para a temperatura induzida. Os números representam as diferentes densidades nas arenas experimentais separadas entre si e distinguidas com a coloração preta para os controlos e azul e laranja para eventos de predação, sob temperatura ambiente e induzida, respetivamente	28
Figura 10 - Exemplar do predador sobre papel milimétrico (escala) de cada um dos locais (Múrcia - <i>S. fonscolombii</i> (a), Toledo - <i>Notonecta</i> sp. (b), Évora - <i>C. erythraea</i> (c), Porto - <i>L. quadrimaculata</i> (d), Jaca - <i>L. barbarus</i> (e) e Peñalara - <i>Agabus</i> sp. (f))	30
Figura 11 - Biomassa média das presas consumidas em função da biomassa média dos predadores e erros-padrão dos seis locais. O esquema de cores representa o gradiente térmico dos seis locais: Múrcia (vermelho escuro), Toledo (vermelho), Évora (amarelo), Porto (azul claro), Jaca (azul ciano) e Peñalara (azul escuro)	32

Figura 12 - Número médio de presas consumidas em função da densidade inicial de presas. Representação do tratamento de controlo (retas e triângulos a azul) e do tratamento de aquecimento (retas e círculos a laranja) com erros-padrão das seis áreas de estudo.....	40
Figura 13 - Curvas de resposta funcional obtidas no tratamento de controlo (temperatura ambiente média) das seis áreas de estudo. O esquema de cores representa o gradiente térmico dos seis locais: Múrcia (vermelho escuro), Toledo (vermelho), Évora (amarelo), Porto (azul claro), Jaca (azul ciano) e Peñalara (azul escuro)	41
Figura 14 - Polígonos estimados do número de presas consumidas em função da densidade inicial de presas por local sob temperatura ambiente (a azul) e temperatura induzida (a laranja). O tamanho dos polígonos indica a variação entre os replicados de cada tratamento (quanto maior for a largura do polígono maior é a variabilidade existente)	42
Anexo I Figura 1 - Replicado com 40 presas (<i>Daphnia pulicaria</i>) e respetivo predador (<i>Crocothemis erythraea</i>) de uma das experiências do estudo-piloto.....	64
Anexo I Figura 2 - Controlos com 10 presas cada de uma das experiências do estudo-piloto	64
Anexo I Figura 3 - Suporte e câmara digital utilizados para a obtenção de fotografias das experiências do estudo-piloto	65
Anexo I Figura 4 - Desenho experimental do 1º ensaio do estudo-piloto com as densidades de 10, 20 e 40 presas (dois replicados para cada).....	65
Anexo I Figura 5 - Desenho experimental do 2º ensaio do estudo-piloto com controlos de 10 presas (preenchimento a preto) e com as mesmas densidades que o estudo anterior (círculo cinzento) e uma densidade adicional de 80 presas (círculo preto).....	66
Anexo I Figura 6 - Desenho experimental do 3º ensaio do estudo-piloto igual ao da experiência anterior, variando apenas nas horas de contagem das presas	66
Anexo I Figura 7 - Desenho experimental do 4º ensaio do estudo-piloto com dois replicados adicionais para a densidade de 80 presas (círculo a preto), sem controlos e com a mesma duração das experiências de predação em campo	66

Índice de tabelas

Tabela 1 - Temperatura média do mês anterior à amostragem e respetiva temperatura induzida de cada área de estudo	24
Tabela 2 - Espécies e géneros de predadores e presas envolvidos nas experiências de predação nas seis áreas de estudo (pares de interação com respetiva abreviatura), assim como a proporção das presas envolvidas em Toledo e estado de desenvolvimento dos indivíduos deste local e de Peñalara	31
Tabela 3 - Fórmulas de tamanho-biomassa consideradas para obter a biomassa média de cada predador. Os parâmetros correspondentes à família apresentada na fonte foram ajustados a cada local (para Múrcia, Évora e Porto houve correspondência com a família do predador, mas para Toledo, Jaca e Peñalara foram escolhidos parâmetros de famílias com tamanho e forma similares)	31
Tabela 4 - Biomassa média de cada predador e biomassa média consumida por local com os respetivos erros-padrão de cada uma das biomassas.....	33
Tabela 5 - Análises estatísticas para os dois tratamentos com o tipo de resposta em cada local, segundo a fase de ajuste de modelos (pacote <i>stats</i>). Valor de p : '****' $p < 0.001$, '*' $p < 0.05$, '.' $p < 0.1$	36
Tabela 6 - Análises estatísticas para os dois tratamentos com o tipo de modelo considerado em cada local, com base nos valores do critério AIC e nível de significância (pacote <i>stats</i> e função <i>nls</i>). As estimativas dos coeficientes a e Th foram reportadas quando os parâmetros se evidenciavam significativos. Valor de p : '****' $p < 0.001$, '**' $p < 0.01$, '*' $p < 0.05$	37
Anexo I Tabela 1 - Análise estatística do último ensaio do estudo-piloto. Valor de p : '****' $p < 0.001$	67
Anexo III Tabela 1 - Análises estatísticas segundo o pacote <i>frair</i> . Valor de p : '****' $p < 0.001$	68

1. Introdução

1.1. Contexto

Nos últimos anos, as alterações ambientais (p. ex. alterações ao nível do clima e do uso do solo) têm vindo a acentuar-se com a ação antropogénica. Particularmente, prevê-se que a mudança climática global (GCC - *Global Climate Change*) seja a principal ameaça à biodiversidade nas próximas décadas (Bálint *et al.*, 2011). Os extremos climáticos são cada vez mais frequentes e intensos, sendo previsível que o aumento da temperatura abrupto acelere e intensifique as taxas de perda de diversidade à escala global, afetando a integridade funcional dos ecossistemas (Aspin *et al.*, 2018). Esta taxa de extinção já é superior à documentada no registo fóssil, sendo considerada como a sexta extinção em massa (Bellard *et al.*, 2012; Kolbert, 2019). Dada esta crise de biodiversidade que se presencia, tem sido uma preocupação constante o que se sucederá e que ainda se desconhece (Singh, 2002). Segundo Bellard *et al.* (2012), também se sabe que, para além dos possíveis efeitos negativos, também poderão haver efeitos positivos sobre a biodiversidade (p. ex. aumento de diversidade), mas existem poucos estudos que o comprovem. Porém, ainda existem lacunas de conhecimento quanto aos potenciais efeitos e consequências derivadas desta problemática.

Recentemente, têm surgido estudos que abordam os efeitos das alterações climáticas relativamente ao futuro da biodiversidade (Bellard *et al.*, 2012; Boggs, 2016), com o foco em encontrar soluções e medidas de adaptação e/ou atenuação para os impactos subjacentes. Os possíveis efeitos podem operar à escala do indivíduo, população, interação ao nível da comunidade, rede trófica e bioma (Bellard *et al.*, 2012). Consequentemente, as espécies podem responder por microevolução, alterando o seu nicho climático ao longo do tempo (p. ex. fenologia) ou, por outro lado, podem responder a nível fisiológico, morfológico e/ou comportamental (p. ex. dieta), de forma a acompanharem o ritmo acelerado da problemática e persistirem (Bellard *et al.*, 2012). O nicho climático é definido pelas faixas de temperatura nas quais o organismo tem fitness elevado e é calculado através de curvas de desempenho térmico (Boggs, 2016). É possível projetar o referido nicho para futuros cenários distintos, de modo a determinar o potencial aumento, diminuição ou redistribuição do espaço climático adequado a cada espécie (Bellard *et al.*, 2012). Então, prever as respostas da biodiversidade tem sido e

continuará a ser um dos principais focos de investigação e as previsões que advêm destes estudos detêm um papel fulcral no desenvolvimento de estratégias e na tomada de decisão por parte de cientistas e decisores políticos (Bellard *et al.*, 2012).

A avaliação e implementação de medidas de resposta derivadas destes estudos poderá contribuir para a manutenção do bom funcionamento de ecossistemas mais vulneráveis, assegurando a sua estabilidade e equilíbrio e promovendo a sua preservação, assim como das espécies que neles ocorrem. Os sistemas aquáticos são um bom exemplo disso, sendo fundamentalmente importantes para o meio ambiente, a biosfera e as populações, encontrando-se extremamente vulneráveis aos impactos antropogénicos e às mudanças de clima (Dubois *et al.*, 2017). Assim, é importante compreender de que modo estes ecossistemas respondem através do tempo e do espaço, o que é crucial para garantir a sustentabilidade dos seus recursos. Neste sentido, têm sido sugeridos estudos paleolimnológicos que permitam estabelecer as condições base destes ecossistemas no passado, para se obter uma melhor compreensão das suas respostas atuais (Dubois *et al.*, 2017). Alguns estudos mostraram que os níveis de exposição dos organismos à radiação UV tem aumentado com o aquecimento, todavia ainda se desconhecem muitos outros fatores ambientais que operam nestes ambientes. Por esse motivo, torna-se importante recorrer a instalações experimentais (p. ex. mesocosmos) que facilitem a perceção dos possíveis efeitos e consequências, evitando intervir nos ambientes em causa, dada a sua fragilidade (Williamson *et al.*, 2019). Os mesocosmos são unidades experimentais de tamanho médio, relativamente isoladas e parcialmente fechadas, as quais são mantidas no exterior (Odum, 1984), permitindo replicar a complexidade física, química e biológica de sistemas naturais em condições controladas (Stewart *et al.*, 2013; Aspin *et al.*, 2018). Como tal, o presente estudo foi realizado no âmbito do projeto Iberian Ponds (ver detalhes na secção “Instalação experimental Iberian Ponds”).

As alterações climáticas, nomeadamente o aumento da temperatura, podem influenciar as taxas metabólicas e biológicas e as interações bióticas, destacando as interações predador-presa (Bellard *et al.*, 2012; Sentis *et al.*, 2017). Tal, pode modificar a intensidade das interações (Vesely *et al.*, 2017), a dinâmica das populações e das comunidades, levando a alterações do funcionamento dos ecossistemas (Bellard *et al.*,

2012; Sentis *et al.*, 2017). Também o padrão de distribuição das espécies pode ser afetado pelos efeitos térmicos, podendo levar à extinção das mesmas (Bálint *et al.*, 2011). Estas modificações podem ser positivas ou negativas, isto é, benéficas ou prejudiciais, dependendo da frequência e duração da exposição a que os indivíduos estão sujeitos, o que requer investigação e monitorização contínua (Boggs, 2016; Williamson *et al.*, 2019). Contrariamente ao que se verificava no passado, as espécies enfrentam, atualmente, ameaças que poderão atuar em conjunto com as alterações climáticas (Bellard *et al.*, 2012) e estas pressões ambientais intensificar-se-ão, cada vez mais, de modo combinado (García *et al.*, 2018). Comumente, associado ao aquecimento global tem-se verificado também a perda de predadores importantes, sendo que estas respostas são invariavelmente estudadas de modo isolado e não em simultâneo, como seria preferível (Antiqueira *et al.*, 2017). Embora, a perceção dos efeitos combinados seja de difícil alcance, é necessário estudar as possíveis interações, quer sejam sinérgicas ou antagónicas, relacionando com a biodiversidade e a multifuncionalidade do ecossistema (isto é, a diversidade funcional do ecossistema) (Antiqueira *et al.*, 2017).

O estudo de previsão deverá incidir sobre grupos ainda pouco conhecidos, havendo a necessidade de se estudar uma parte mais abrangente da diversidade biológica. Sabe-se que a variedade de espécies e de grupos que são estudados representam uma ínfima percentagem da biodiversidade que é conhecida (Bellard *et al.*, 2012), existindo ainda muito para se conhecer (Hortal *et al.*, 2015). A maioria dos estudos encontra-se enviesada, concentrando-se em grupos taxonómicos mais conspícuos. No entanto, é reconhecido que, em termos de riqueza específica, divergência evolutiva, biomassa e serviços do ecossistema, a diversidade é representada pelo que se designa por “biodiversidade enigmática”, como o caso dos insetos (Bellard *et al.*, 2012). Os insetos (Classe: Insecta) são um grupo de organismos com ciclo de vida curto, fortemente influenciados pelo microclima que os rodeia (Boggs, 2016), daí a escolha de predadores e presas pertencentes a este grupo. Estes são considerados como organismos ectotérmicos (Colinet *et al.*, 2015), uma vez que a sua temperatura corporal varia diretamente com as condições térmicas ambientais em atividade e repouso (Heinrich, 1973), não sendo esta temperatura ajustada através do controlo homeostático endógeno (Abram *et al.*, 2017). Geralmente, exibem respostas fisiológicas às mudanças ao nível da temperatura, traduzindo-se em alterações nas taxas vitais, afetando a

dinâmica populacional (Boggs, 2016), as quais têm sido relatadas desde a mudança climática do século XX (Bellard *et al.*, 2012). Estes organismos são particularmente vulneráveis ao aquecimento (Paaijmans *et al.*, 2013), com certas características muito sensíveis, como é o caso do tamanho corporal, que atinge um limite fisiológico e satura em ambientes extremos (Bellard *et al.*, 2012). Muitas destas mudanças que ocorrem a diversos níveis, provocadas por extremos de temperatura flutuantes (p. ex. uma onda de calor) podem ter como resultado alterações nas interações entre espécies e taxas de crescimento populacional, o que se reflete ao nível da composição da comunidade (isto é, alterações em termos de número de espécies) (Boggs, 2016). Os requisitos energéticos dos predadores, aliados às interações tróficas, permitem explorar as potenciais mudanças na abundância de populações naturais (Archer *et al.*, 2019). Uma onda de calor é vista como uma mudança de temperatura abrupta numa escala de tempo muito reduzida (Sentis *et al.*, 2015), quando comparada à temperatura habitual da época de um determinado local. Dito isto, estes são os principais problemas científicos subjacentes ao efeito das alterações climáticas nas interações predador-presa.

1.2. Interações bióticas

A dinâmica entre as espécies e o papel que estas desempenham nas redes tróficas é essencial (Bellard *et al.*, 2012). Nas interações bióticas atuam dois processos distintos, o de nicho (isto é, respostas determinísticas a um estímulo ambiental) e o neutro (isto é, alteração a nível demográfico resultante de processos estocásticos). O primeiro determina a probabilidade de duas espécies interagirem com base em características funcionais (a ocupação de habitat, o tamanho corporal, a fenologia e a coocorrência), relações filogenéticas e distribuição geográfica. Por sua vez, no processo neutro a probabilidade de duas espécies interagirem é proporcional ao produto das suas abundâncias relativas (Pomeranz *et al.*, 2018). Desvendar a contribuição relativa destes dois processos é determinante para se estudar e prever o modo como as alterações em interações-chave podem afetar as redes tróficas.

Numa comunidade, as redes tróficas são representadas pelo conjunto de cadeias tróficas que interagem entre si (Pomeranz *et al.*, 2018), formando módulos de interações (p. ex. predação) (Chase, 2003) com organismos que se ligam direta e indiretamente (Jackson *et al.*, 2017). Como tal, é essencial compreender a estrutura e a função destas

redes para averiguar de que modo as comunidades são alteradas através dos gradientes ambientais (Pomeranz *et al.*, 2018). Existem ainda poucos estudos que abordam esta questão de como as cadeias tróficas respondem a alterações ambientais, dada a dificuldade que existe na quantificação das interações entre espécies (Pellissier *et al.*, 2018). Portanto, existe um interesse crescente no desenvolvimento de métodos robustos que permitam inferir determinadas interações entre as espécies (p. ex. ao nível de dieta), o que passa por relacionar as respetivas características funcionais (Morales-Castilla *et al.*, 2015). Estudos futuros deverão englobar diferentes metodologias apropriadas e descodificar as ligações existentes entre si, com base nas características funcionais e dados da estrutura da comunidade disponíveis (Pellissier *et al.*, 2018).

As interações predador-presa (interações tróficas entre um consumidor e o respetivo recurso (Archer *et al.*, 2019; Pritchard *et al.*, 2017)) exibem a resposta funcional de um predador carnívoro, ao alimentar-se doutro organismo (presa), havendo transferência de energia deste último para o primeiro quando ocorre mortalidade (Lampert & Sommer, 2007). Nos sistemas aquáticos, estas interações podem ser entre predadores macroinvertebrados e presas zooplanctónicas (p. ex. predadores da ordem Coleoptera e presas da ordem Cladocera), sendo o caso do presente estudo, ou entre macroinvertebrados (p. ex. os mesmos predadores com presas da ordem Diptera) (Pomeranz *et al.*, 2018). É de salientar a importância da conservação de predadores de topo (p. ex. larvas da ordem Odonata), uma vez que detêm um papel essencial na manutenção destes sistemas, na ausência de peixes.

O estudo de quantificação das interações predador-presa é feito através da determinação das curvas de resposta funcional. Estas curvas representam a intensidade e o modo como os predadores consomem as presas (Figura 1). Nesta figura, estão representadas as possíveis respostas funcionais dos predadores ao nível de presas consumidas (ataques bem-sucedidos) em função da sua densidade/abundância (Solomon, 1949; Englund *et al.*, 2011), através das curvas (I, II e III) descritas por Holling. Em concreto, estas curvas descrevem a taxa de consumo *per capita* de presas pelo predador, a qual é afetada pela disponibilidade, procura, captura (a) e manipulação (h) dos recursos por parte do consumidor ou predador (Holling, 1959). Nas respostas funcionais de tipo I (curva linear) e III (curva sigmoideal), a taxa de consumo de presas não

aumenta com a sua densidade e não é verificada uma saturação gradual, ao invés da resposta de tipo II (curva hiperbólica) (Holling, 1959; Denny, 2014). Nesta última, o predador fica saciado ao longo do tempo (T) e é frequentemente verificada em invertebrados (Holling, 1965; Holling, 1966). A resposta funcional, não só pode variar de local para local, se os ambientes forem distintos, como também pode variar consoante o predador, resultado da combinação de diversos efeitos diretos e indiretos, a nível individual e populacional (Ewald *et al.*, 2013).

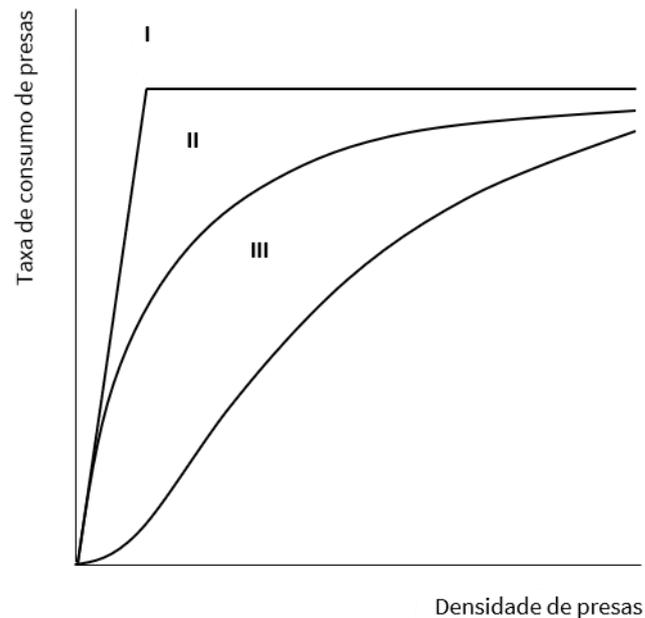


Figura 1 - Gráfico de resposta funcional (curvas de tipo I, II e III) segundo Holling

1.3. Estado da arte

De acordo com Sentis *et al.* (2017), as interações predador-presa em ambientes aquáticos são influenciadas pelo aumento da temperatura, isto é, aumenta a taxa de consumo de presas por parte dos predadores a curto prazo, num sistema de predador simples (experiência com apenas um predador). Os predadores tendem a ficar mais ativos e tornam-se mais eficientes na procura e manipulação de presas, alimentando-se mais. Os autores obtiveram uma resposta funcional de tipo II para os predadores (duas espécies da ordem Odonata no estado larvar) sob diferentes temperaturas durante 6 h, tendo consumido presas zooplancónicas (*Daphnia magna*, Cladocera: Daphniidae). Segundo Veselý *et al.* (2017), estudos prévios têm mostrado que a taxa de predação aumenta, frequentemente, com a temperatura, o que também acontece com altas densidades de presas, ocorrendo saturação da resposta funcional tipo II quando é

atingida a taxa de consumo máxima. O aquecimento da água vai acelerar os processos fisiológicos (metabolismo e digestão) do predador, influenciando positivamente a sua eficiência na captura das presas, dada a sua necessidade energética. Estudos similares utilizando larvas da ordem Coleoptera como predadores demonstraram que o aquecimento também pode ter um efeito indireto no aumento das taxas de consumo, através de um efeito positivo na taxa de crescimento de presas, o que garantiu maiores taxas de predação (Boggs, 2016). Por fim, outro estudo relevante (Ingram & Burns, 2018), com um predador da família Notonectidae e presas zooplânctônicas, mostra que, do aumento da temperatura, resulta uma maior atividade por parte dos predadores, consumindo mais zooplâncton, diminuindo a abundância relativa de determinados organismos (p. ex. *Daphnia* sp.). De acordo com o estudo, foram também realizadas análises de isótopos estáveis para perceber se o predador era zooplânctívoro.

Deste modo, os estudos recentes sobre esta temática parecem coincidir na existência de um efeito da temperatura nas interações, nomeadamente através do aumento de atividade e/ou consumo de presas.

1.4. Estudo

Para se estudar o efeito da variação da temperatura nas interações predador-presa foram efetuados ensaios de predação (interação trófica). Alguns estudos (p. ex. Sentis *et al.*, 2012 e Sentis *et al.*, 2017) têm mostrado que o aquecimento acentua estas interações, provocando o desequilíbrio e a instabilidade de cadeias tróficas com perda de ligações a longo prazo, causando efeitos em cascata na população e na comunidade. Neste sentido, é urgente compreender de que modo e em que medida a dinâmica é afetada, porque as interações bióticas dependem do clima e são uma das principais forças estabilizadoras da estrutura das comunidades ecológicas (Gilman *et al.*, 2010, Englund *et al.*, 2011). Assim, a temperatura poderá favorecer ou prejudicar os organismos envolventes (p. ex. o aquecimento pode estabilizar a dinâmica predador-presa, mas pode levar à diminuição da diversidade de pares de interação, segundo Weinbach *et al.*, 2017). Se o aquecimento afetar diretamente os predadores de topo, os impactos das alterações climáticas na multifuncionalidade dos ecossistemas serão agravados (Antiqueira *et al.*, 2017). No presente estudo, os ensaios de predação foram realizados em sistemas aquáticos artificiais, conferindo a perceção fundamental à manutenção da integridade ecológica

dos sistemas naturais, preservando redes ecológicas complexas (Beauchamp *et al.*, 2006; Kalinkat *et al.*, 2013).

Nos mesocosmos em estudo coexistem diferentes grupos de organismos aquáticos, incluindo macroinvertebrados e zooplâncton, que podem constituir-se como predadores e respectivas presas. Assim, são distintas as possíveis interações (pares de interação) que se manifestam em cada local. Com base em dados anteriores, ocorrem principalmente quatro potenciais predadores que podem ou não estar presentes em simultâneo. A figura 2 é meramente ilustrativa, não estando à escala real, mostrando os predadores dispostos conforme a sua distribuição na coluna de água. Estes pertencem às seguintes famílias: 1 - Gerridae (alfaiates, ordem Hemiptera), 2 - Notonectidae (barqueiros, ordem Hemiptera), 3 - Libellulidae larva (libélulas, ordem Odonata) e 4 - Dytiscidae adulto (escaravelhos aquáticos, ordem Coleoptera). Relativamente à sua distribuição na coluna de água, os alfaiates encontram-se à superfície, as libélulas são bentónicas e os restantes encontram-se na coluna de água (Kriska, 2013), tendo distintas estratégias de captura (p. ex. as espécies de Odonata detêm a estratégia *sit-and-wait* (Sentis *et al.*, 2017)). Alguns destes predadores podem ser mais especialistas em zooplâncton, o que torna a interação mais eficaz, contrariamente a outros que sejam mais generalistas. Para cada local é, então, escolhido um par de interação, segundo critérios descritos na metodologia.

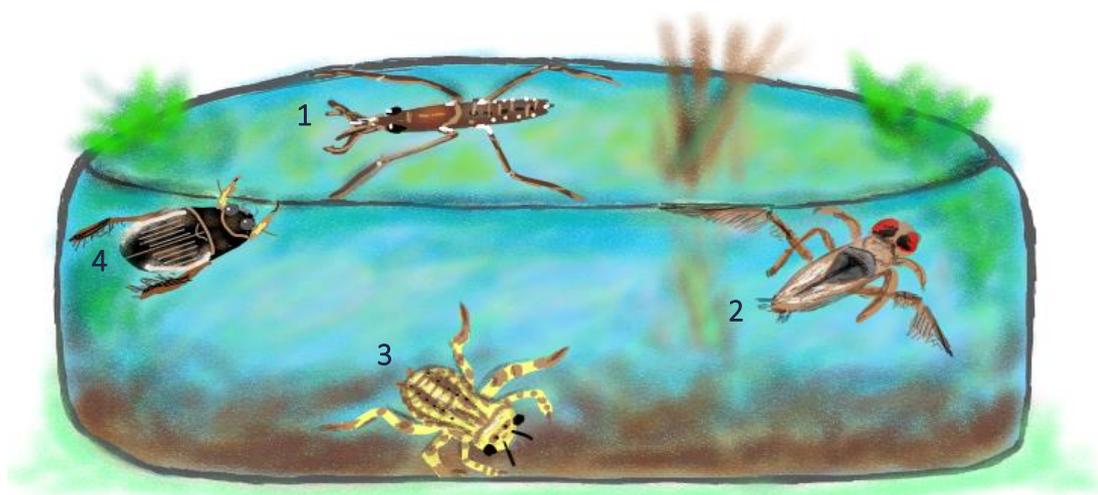


Figura 2 - Representação dos potenciais predadores presentes nas áreas de estudo, distribuídos na coluna de água de um mesocosmo

No presente estudo, as interações predador-presa foram estimadas através da combinação de duas abordagens distintas. Uma das abordagens engloba análise de

dados, de bibliografia e de dados preliminares qualitativamente analisados, enquanto a outra abordagem, de cariz experimental, quantifica as interações *in situ*. A primeira reúne dados de abundância, tamanho corporal, biomassa e características funcionais dos indivíduos, com base na triagem, identificação, medição e pesquisa bibliográfica prévias de macroinvertebrados e zooplâncton, respetivamente. Em contrapartida, a segunda abordagem fornece informação relativa a densidade e presença/ausência de indivíduos. No final, toda a informação obtida pode ser compilada, gerando redes de interações para os mesocosmos, conseguidas através da junção destas vias experimental e computacional.

Os predadores do estudo são insetos e num sentido mais amplo e funcional são macroinvertebrados que representam um grupo de elevada importância que reage rapidamente a perturbações. Alguns dos quais podem ser bioindicadores dos ambientes em que ocorrem, mostrando a qualidade dos mesmos. Para além disso, trata-se de um grupo bastante diversificado, principalmente ao nível das funções ecológicas que os constituintes exercem, desempenhando, não só o papel de predador (engolidor ou perfurador), mas ainda outros papéis cruciais (raspador, fragmentador, triturador, entre outros) nas cadeias tróficas, consoante a sua adaptação morfológica e distribuição na coluna de água (Durance & Ormerod, 2007).

Quanto ao zooplâncton, este grupo é composto por organismos com ciclo de vida curto (Weinbach *et al.*, 2017). Alguns dos organismos mais abundantes são crustáceos de reduzidas dimensões (p. ex. *Daphnia* sp.), que se alimentam de fitoplâncton. Deste modo, transferem a energia primária fornecida pelos produtores a níveis tróficos mais elevados, através da predação (Langer *et al.*, 2019). Segundo Langer *et al.* (2019), os organismos tendem a adaptar comportamentos anti-predatórios na presença de predadores, ao nível da locomoção e dispersão dos organismos. A locomoção ao longo da coluna de água é realizada verticalmente, na qual os organismos se encontram concentrados, o que pode confundir os predadores. Por sua vez, a nível morfológico, detêm saliências resistentes (p. ex. espinhas) que dificultam a sua captura e manipulação. Este tipo de presas responde rapidamente às alterações ambientais (Langer *et al.*, 2019), logo o aumento da temperatura, ainda que por tempo reduzido, poderá ter efeitos críticos para

o zooplâncton (Graham & Vinebrooke, 2009), afetando os seguintes níveis de consumidores.

1.4.1. Objetivos e hipóteses

Este estudo teve como objetivo geral, perceber se o aumento da temperatura induzido, 5 °C face à temperatura ambiente, modifica as interações predador-presa entre locais. Esta variação simula o aumento de +1 °C relativamente à temperatura ambiente prevista para 2100, segundo o IPCC (Collins *et al.*, 2013). Por sua vez, o estudo teve como objetivos particulares, compreender se as taxas de consumo das presas são afetadas pela densidade das mesmas e, ainda, se os predadores são generalistas ou especialistas em termos de utilização dos recursos disponíveis, com base em determinadas características morfológicas e comportamentais.

As hipóteses deste estudo são as seguintes: (H1) o aumento da temperatura potencia as interações entre predadores e respetivas presas em cada local; (H2) a taxa de consumo de presas é maior em arenas experimentais com densidades elevadas de presas; (H3) a taxa de consumo é superior com predadores especialistas que apresentam determinadas características funcionais, morfológicas e comportamentais que facilitam a interação.

Estas hipóteses surgem de dados preliminares com macroinvertebrados, provenientes de amostragens anteriores, que indicam variações de local para local nestas interações. Sendo assim, é pertinente comparar a taxa de predação sob temperatura baixa (ambiente) e sob temperatura alta (induzida), semelhante ao que se verifica nos mesocosmos aquecidos e não aquecidos de cada local (oito de cada). As principais variáveis em estudo são a densidade e o tamanho corporal, sendo que a densidade compreende o número de presas por litro, denotando a resposta funcional *per capita* de cada espécie de predador envolvida. Quanto ao tamanho corporal, este também é relevante, na medida em que tende a diminuir com o aumento da temperatura (fator). As cadeias tróficas são diferentes entre locais, logo as respostas funcionais também o são, dado que os pares de interação são diferentes. Simultaneamente, as ligações tróficas também são distintas em cada local, de mesocosmo para mesocosmo. É esperada uma resposta funcional de tipo II para a maioria dos predadores, contudo prevê-se que locais com clima semelhante apresentem o mesmo tipo de resposta. Em

termos de tamanho corporal e biomassa, é esperada uma diminuição nestes parâmetros em locais com temperatura ambiente superior.

2. Metodologia

2.1. Instalação experimental Iberian Ponds

O estudo integra-se no projeto Iberian Ponds da Cátedra “Rui Nabeiro” - Biodiversidade da Universidade de Évora, a decorrer desde 2013. Este projeto, com intuito de testar os efeitos das alterações climáticas sobre a estrutura das redes ecológicas, tem uma abordagem experimental com um total de 192 mesocosmos distribuídos por seis locais da Península Ibérica (Figura 3). Esta instalação possibilita condições controladas ao nível da temperatura, sendo esta mediada por sensores e um sistema de aquecimento. Desta forma, há representação da variedade de regiões bioclimáticas da Península Ibérica (gradiente térmico), o que permite a comparação de potenciais efeitos do aquecimento sobre a integridade estrutural e funcional das cadeias tróficas existentes.

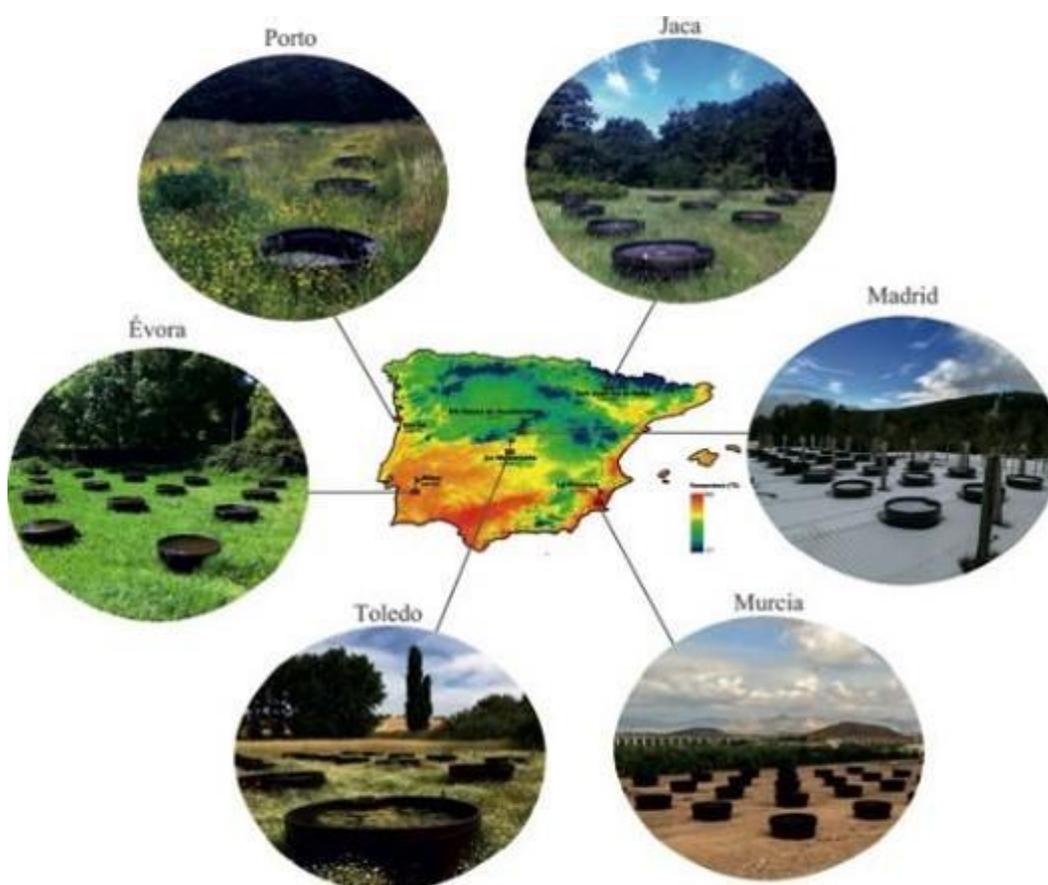


Figura 3 - Distribuição dos mesocosmos nos diferentes locais da Península Ibérica, de acordo com o gradiente térmico

Os mesocosmos consistem em charcos artificiais de água doce com forma circular (medidas: 0.70 m de profundidade e 1.85 m de diâmetro), com capacidade máxima de 1000 L e instalados a 3-5 m de distância entre si. Estes foram instalados em cada local em 2014, adicionando substrato e água recolhidos de proveniência local, onde permaneceram sem manipulação durante um mês. Este período permitiu o estabelecimento de produtores primários (bactérias e microalgas). Depois deste período inicial procedeu-se a uma inoculação com sedimentos, água e outros organismos de charcos naturais e artificiais próximos de cada instalação. Esta inoculação permitiu o aumento do fundo genético de populações ao nível de produtores, pequenos e grandes consumidores (zooplâncton e macroinvertebrados), bem como de macrófitos, entre outros organismos.

2.2. Áreas de estudo

As áreas de estudo, representadas na Figura 3, cada uma com 32 mesocosmos, compreendem três tipos de ambiente, os quais: Múrcia e Toledo com clima semi-árido, Évora e Porto com temperado (com influência mediterrânica e atlântica, respetivamente) e Jaca e Peñalara com alpino. Os mesocosmos são vantajosos, pois permitem processos de colonização que se assemelham aos processos naturais *in situ*, com papel preponderante na caracterização e comparação das cadeias tróficas das áreas experimentais, dada a sua distribuição e elevada replicação. Tudo isto, providencia oportunidades para testar os efeitos das alterações climáticas (experiências com aquecimento e seca) na estrutura e funcionamento de ambientes aquáticos, com monitorização a cada primavera, através de procedimentos-padrão.

A informação relativa às secções anteriores (Instalação experimental Iberian Ponds e Áreas de estudo) foi consultada nas seguintes ligações (01/03/18): www.aquacosm.eu; www.iberianponds.uevora.pt; www.maraujolab.com; www.iifa.uevora.pt.

2.3. Caracterização de comunidades aquáticas

A componente laboratorial foi desenvolvida no laboratório estruturado pelo projeto (Casa Cordovil, Universidade de Évora). Nesta componente foi efetuada a triagem de macroinvertebrados, que antecede a identificação dos mesmos. Para estes procedimentos utilizaram-se as amostras provenientes da amostragem de 2018. Durante

o primeiro procedimento, as amostras foram limpas e analisadas ao microscópio numa caixa de Petri, da qual foram recolhidos todos os macroinvertebrados, excetuando casos com um elevado número de organismos (p. ex. Chironomini) em que se procedeu a uma subamostragem com separadores de madeira de 8 x 8 (subamostras). Aquando da recolha dos organismos, quer se trate de uma triagem total ou subamostragem, estes foram colocados em etanol em frascos de 10 ml etiquetados (local, número do mesocosmo e ano, tendo sido apontado o número de quadrados triados para o segundo caso).

Na fase procedente à triagem, os macroinvertebrados foram identificados à categoria taxonómica mais precisa. Esta identificação foi efetuada segundo Tachet *et al.* (2010) para todas as ordens amostradas, possibilitando identificar até ao género e, mais especificamente, em Askew (2004), Nilsson (2005), Cham (2014) e Dijkstra (2018) para as espécies da ordem Odonata e em Millán *et al.* (2014) para as de Coleoptera. Simultaneamente, foram averiguadas as espécies presentes na Península Ibérica de acordo com a base de dados Iberfauna (<http://iberfauna.mncn.csic.es>).

2.4. Determinação de estrutura de tamanhos e identificação de potenciais predadores e presas

A medição de macroinvertebrados foi efetuada com recurso ao *software* ImageJ (versões 1.52a e 1.50e, <https://imagej.nih.gov/ij>), com base em fotografias previamente obtidas das amostras respetivas às amostragens de 2016 a 2018. Estas fotografias foram efetuadas com um microscópio estereoscópico (Olympus SZX7, incluindo uma objetiva Olympus PL 0.5X⁴) conectado a um computador com um adaptador (Olympus XC30), recorrendo ao *software* cellSens Entry da Olympus (versão 1.17) (Figura 4). Durante esta fase foram também realizados procedimentos como a pesquisa bibliográfica e a análise de dados, segundo a base de dados Freshwater Ecology (www.freshwaterecology.info), para obter características funcionais das espécies. Os valores do comprimento, a identificação das espécies por abundância e as respetivas características funcionais foram organizadas num ficheiro Excel, para posterior análise estatística no programa R.

Para se obter a biomassa de todos os organismos amostrados e inferir as interações das experiências, procedendo à análise estatística, foi necessário calcular a biomassa individual com base na fórmula de tamanho-biomassa ($W = aL^b$, onde W corresponde à

biomassa (mg), L é o comprimento (mm) e a e b são parâmetros ajustados que determinam a relação alométrica entre as referidas variáveis (Sabo *et al.*, 2002)). Os parâmetros a e b foram visualizados no estudo de Benke *et al.* (1999) para os predadores das experiências e macroinvertebrados no geral, à exceção de alguns géneros da classe Gastropoda que foram vistos em Towers *et al.* (1994). Para as espécies de presas, os parâmetros foram analisados previamente em Dumont *et al.* (1975), tendo sido calculada, posteriormente, a biomassa média consumida por cada local. A determinação dos tamanhos corporais de todas as espécies e géneros derivados das amostragens locais permitiu a obtenção de espectros de tamanho (distribuição dos comprimentos), segundo Yvon-Durocher *et al.* (2011), utilizadas na identificação de potenciais interações predador-presa.



Figura 4 - Microscópio estereoscópico utilizado para fotografar e identificar macroinvertebrados

Na fase de medição de macroinvertebrados amostrados foram medidos todos os potenciais predadores, tendo em conta a sua abundância média em cada local, a partir da qual foi realizada uma pré-seleção. É importante salientar que de ano para ano o fundo genético variou bastante, o que podia ocorrer novamente nos diferentes locais. Para as presas, foi implementado o mesmo procedimento, tendo sido pré-selecionadas as potenciais presas com base nos dados de zooplâncton de amostragens anteriores, sendo que para este grupo se mantiveram as mesmas espécies, facilitando a seleção por local. Esta pré-seleção encontra-se na Figura 5, ilustrando as possíveis interações com os potenciais pares com base nos tamanhos de anos anteriores (os predadores são maiores e menos abundantes e vice-versa para as respetivas presas, o que não se verificou para Toledo). Na figura estão apenas ilustrados os potenciais pares que efetivamente foram

utilizados em todas as experiências, embora tenham sido determinados mais que não estão representados por uma questão de simplicidade. As designações para os predadores e presas encontram-se abreviadas e estão de acordo com a identificação final realizada após os ensaios de predação (ver na Tabela 2 da secção “Ensaio de predação”).

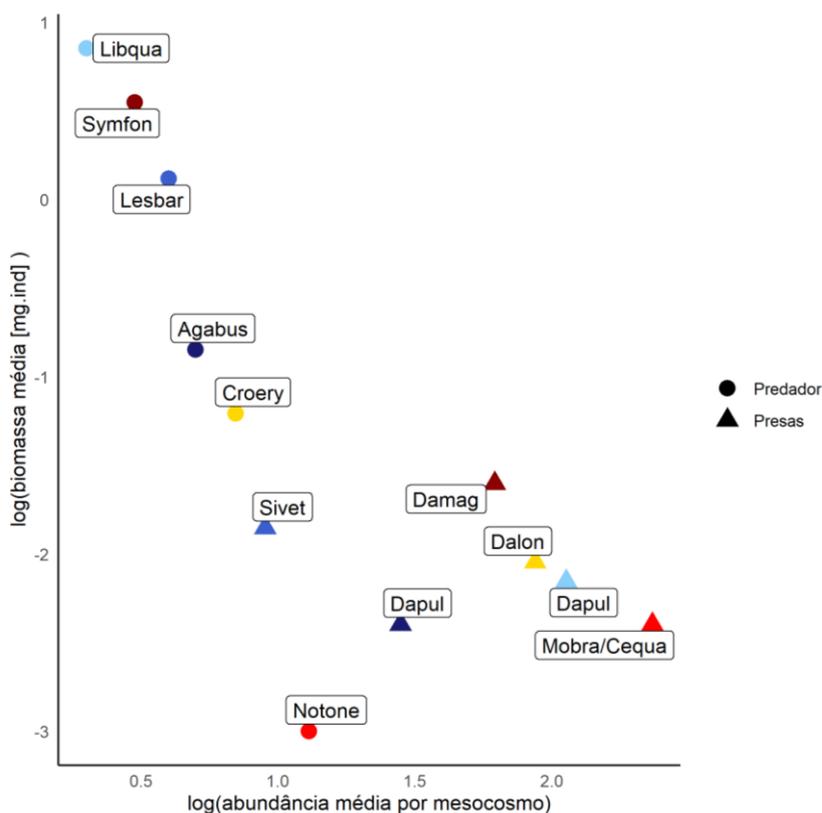


Figura 5 - Potenciais predadores (círculos) e presas (triângulos) utilizados nas experiências, representados de forma abreviada, segundo a respetiva biomassa individual e abundância por mesocosmo. As cores estão de acordo com o gradiente térmico dos seis locais: Múrcia (vermelho escuro), Toledo (vermelho), Évora (amarelo), Porto (azul claro), Jaca (azul ciano) e Peñalara (azul escuro)

2.5. Estudo preliminar de viabilidade do sistema experimental (estudo-piloto)

Realizou-se um estudo-piloto em que os objetivos foram os seguintes: (1) auxiliar o planeamento e delineamento das experiências de predação em campo (ao nível da duração dos ensaios, densidades de predadores e presas, número de replicados por densidade, viabilidade de contagens visuais, entre outros fatores); (2) confirmar a ocorrência de interações entre predadores (larvas da ordem Odonata) e presas zooplanctónicas já observadas em períodos de amostragem anteriores; (3) examinar se esta interação também ocorre com diferentes predadores (ordens Hemiptera e

Coleoptera); (4) perceber qual a taxa máxima de predação por predador consoante as diferentes densidades.

O estudo-piloto consistiu em quatro ensaios experimentais durante janeiro e abril de 2019, durante os quais foram recolhidos predadores e presas abundantes presentes num antigo chafariz da zona exterior da Casa Cordovil. Cerca de oito predadores (*Crocothemis erythraea*, Odonata: Libellulidae) por experiência foram recolhidos com uma rede de aquário (500 µm), tendo sido mantidos durante algumas horas (entre 24-48 h) sem alimento em frascos de vidro. A temperatura do laboratório foi regulada com ar condicionado (programado para os 20 °C ao longo do dia com interrupção ao final deste). A experiência iniciou-se com a colocação das presas (*Daphnia pulicaria*, Cladocera: Daphniidae) previamente recolhidas com a mesma rede, segundo as densidades 10, 20, 40 e 80, em caixas de Petri com o respetivo predador, com duração de 24 h, exceto no último ensaio (Anexo I Figura 1). Os controlos (dois replicados com dez presas cada - Anexo I Figura 2) foram mantidos sem predador durante o mesmo período, permitindo averiguar a mortalidade natural das presas. Simultaneamente, foram efetuadas fotografias e vídeos com uma GoPro (Hero3 - Black Edition) e uma máquina digital (Nikon D7100 com objetiva Nikon) colocadas num suporte preparado para o efeito (Anexo I Figura 3), de forma a documentar o movimento e as interações entre predadores e presas com o *software* Ethovision. Este procedimento também auxiliou na contabilização das presas (principalmente nas densidades mais elevadas), numa fase posterior à experiência. Porém, dada a considerável distância da câmara que impossibilitava visualizar as presas (no caso da GoPro), o facto de serem predadores com reduzida mobilidade e a limitação de tempo levou a que o procedimento de obtenção de fotografias e vídeos não fosse realizado em campo.

Com os resultados obtidos dos primeiros três ensaios, foi possível perceber que a taxa de predação máxima foi verificada entre as 4-6 horas, sendo definida uma duração de 6 h para o quarto ensaio em laboratório e para os procedimentos em campo. O número de presas consumidas pelos predadores em função da densidade inicial de presas do último ensaio (dois replicados para todas as densidades, exceto para as 80 presas com quatro replicados) encontra-se na Figura 6. Os desenhos experimentais dos quatro ensaios que constituíram o estudo-piloto encontram-se em anexo (Anexo I -

Figuras 4 a 7), onde estão também mencionadas as horas que decorreram desde o início das experiências, bem como os períodos em que se fotografaram e contabilizaram as presas. Os resultados do último ensaio mostram uma resposta funcional de tipo II (Figura 6), tendo existido uma forte interação entre predadores e presas com $p < 0.001$ (taxa de consumo elevada, $t_8 = 9.10$, $r^2 = 0.90$; Anexo I Tabela 1). Por último, com base na informação recolhida, foram planeadas e delineadas as experiências de predação para o primeiro período de amostragem. Havia a necessidade de existir a comparação entre duas temperaturas envolvidas para simular uma alteração climática, com maior número de replicados e, por sua vez, com mais densidades (superiores e inferiores às do estudo-piloto).

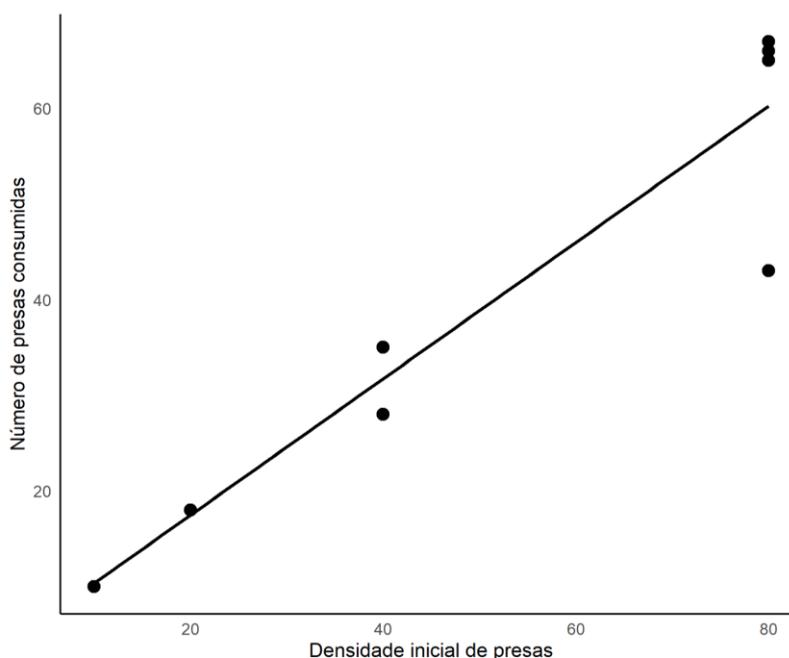


Figura 6 - Número de presas consumidas em função das densidades 10, 20, 40 e 80 do 4º ensaio do estudo-piloto

Os dois tipos de tratamento foram os seguintes: Aquecimento - composto por temperatura de controlo (temperatura ambiente) e uma temperatura de mais 5 °C face à ambiente (induzida), a qual representa o início de uma onda de calor; Densidade de presas - reúne cinco níveis de densidade de presas (8, 16, 32, 64 e 128) com presença de um predador (espécie mais representativa por local com 6-8 replicados por cada densidade de presas).

2.6. Ensaio de predação

Os ensaios de predação foram realizados ao longo do período de amostragem e monitorização *in situ*, no qual também houve uma participação ativa nos procedimentos de campo na primavera de 2019 (para mais detalhes consultar o Anexo II). No primeiro dia de amostragem em cada área de estudo foram analisadas as temperaturas médias do mês anterior, de forma a obter uma temperatura ambiente que representasse o início da primavera de cada um dos locais, evitando qualquer variabilidade que influenciasse os ensaios. Para tal, foram extraídos os dados dos cinco sensores/registadores de temperatura (TidbitV2 HOBO, Onset) presentes em cinco mesocosmos representativos de cada local, o que não aconteceu em Peñalara (apenas três sensores). De uma média global foi obtida a temperatura ambiente de cada local (temperatura de controlo) e com um acréscimo de 5 °C à mesma foi estabelecida a temperatura induzida (aquecimento) (Tabela 1).

Tabela 1 - Temperatura média do mês anterior à amostragem e respetiva temperatura induzida de cada área de estudo

Local	Data	Temperatura ambiente média/ Controlo (°C)	Temperatura induzida/ Aquecimento (+5 °C)
Múrcia	08/03 a 08/04	16.0	21.0
Toledo	13/03 a 13/04	12.5	17.5
Évora	23/03 a 23/04	14.0	19.0
Porto	29/03 a 29/04	14.0	19.0
Jaca	04/05 a 04/06	12.6	17.6
Peñalara	10/05 a 10/06	14.5	19.5

Devido a alguns constrangimentos do desenho experimental e da amostragem no campo, todos os ensaios de predação foram realizados em laboratórios locais. Para simular o início de uma onda de calor num sistema aquático foi preparado um sistema de aquecimento com bombas de aquário (Eheim, de débito 300 L/h), um aquecedor

submersível (Eheim) e um refrigerador (Hailea, modelo HC300) para aumentar e diminuir a temperatura, respetivamente. Foram também utilizados dois termostatos digitais (Proster, STC-1000, de precisão ± 0.1 °C), um para o controlo e outro para o aquecimento, com sensores de temperatura instalados nos tabuleiros de predação (caixa PVC 70 x 41 x 15, de aprox. 34 L). Nestes termostatos foram introduzidas manualmente as temperaturas determinadas, permitindo verificar alterações de temperatura ocorrentes durante a experiência. Os três tabuleiros de predação (dois para temperatura ambiente e um para a temperatura induzida) foram preenchidos com água, nos quais se introduziram as arenas experimentais (recipientes circulares de plástico com 8 cm de diâmetro e 17 cm de altura, de capacidade 260 ml). Estas foram separadas entre si para impedir o contacto visual entre predadores. Por sua vez, as arenas e os separadores foram sustentados por placas brancas de PVC com aberturas em cada tabuleiro, o que permitiu a passagem de água quente e auxiliou o procedimento de registo fotográfico. As bombas de aquário foram submersas em duas caixas de 40 L (duas bombas por caixa), onde permaneceram ligadas aos termostatos. Cada mangueira (13 mm de diâmetro) foi conectada à respetiva bomba, fazendo circular a água da caixa à qual pertencia. A água fria foi obtida da caixa conectada ao refrigerador (com outra bomba) e a água quente foi derivada da caixa com o aquecedor parcialmente submerso. Deste modo, o sistema funcionou corretamente, mediante a dupla mangueira e adaptadores, resfriando e/ou aquecendo os tabuleiros (Figura 7). Tal como se pode denotar na figura, as caixas e os tabuleiros de predação foram colocados, sempre que necessário, numa superfície alta ao mesmo nível, de modo a possibilitar a eficiente circulação da água por intermédio das mangueiras.

No segundo dia de amostragem foram recolhidos os predadores, tendo sido ajustados face às expectativas iniciais (pré-seleção), consoante a ocorrência e abundância de macroinvertebrados em cada local. Durante a fase de seleção e captura, identificaram-se os predadores com base na observação e comparação dos indivíduos, com o intuito de minimizar a introdução de variabilidade na experiência associada a eventuais erros de identificação. A recolha foi efetuada em mesocosmos não aquecidos com uma rede de aquário de malha 250 μ m, tendo sido isolados cada um dos predadores em frascos de 50 ml com água filtrada (filtro de 50 μ m) do local de origem. Por fim, os frascos foram mantidos abertos, tendo apenas uma rede e um elástico no topo, de forma

a serem possibilitadas transferências de água e oxigénio entre o interior do frasco e o exterior. Esta separação também possibilitou evitar eventos de canibalismo entre predadores (predação intraespecífica) durante o período de aclimação. Entre indivíduos da ordem Odonata é comum o canibalismo na ausência de presas, havendo espécies mais vulneráveis a estes eventos (Johansson, 1993). Isto, pode restringir a densidade populacional no sistema aquático (May, 2019). O mesmo também acontece entre larvas de Coleoptera, onde indivíduos maiores consomem os de menores dimensões (Culler *et al.*, 2014).

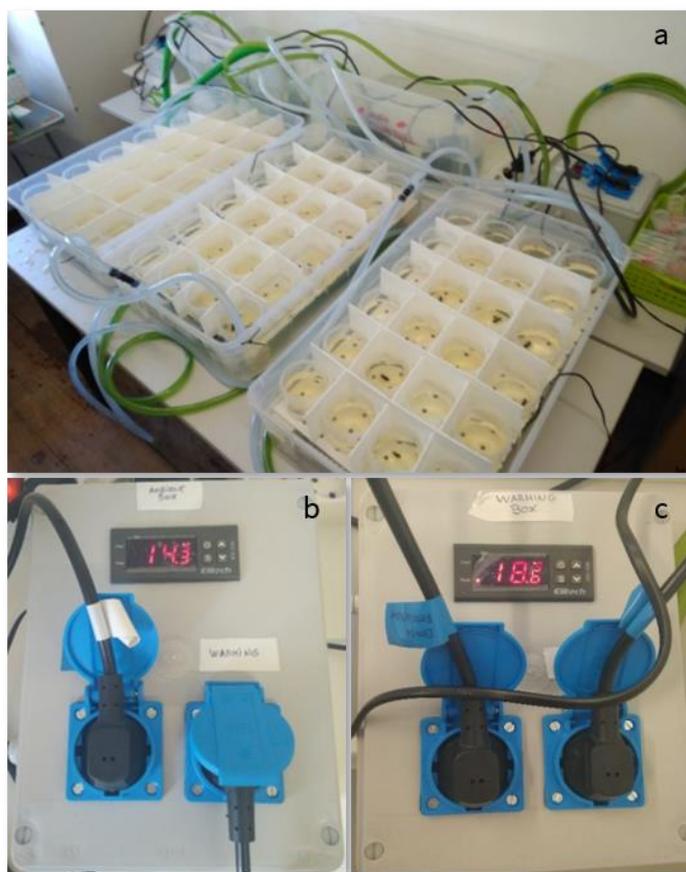


Figura 7 - Sistema de aquecimento utilizado para a experiência de predação (a) e termostatos utilizados para registo da temperatura ambiente (b) e induzida (c) - fotografias da experiência em Évora

Os frascos com predadores foram emergidos horizontalmente numa mistura de água dos mesocosmos com água canalizada (quando a condutividade era aproximada), onde estes permaneciam sem alimento, num tabuleiro com uma bomba de ar (Modelo Marina 50 com duas pedras de difusão) por aproximadamente 42 h (Figura 8). Este procedimento ocorreu em todos os locais, exceto em Toledo, em que os predadores não foram separados em frascos. Estes foram colocados diretamente na mistura, por se tratarem de organismos que se movimentavam ao longo da coluna de água,

contrariamente aos restantes predadores que permaneciam relativamente imóveis. Por sua vez, em Peñalara, foi necessário colocar um nível inferior de água, de modo a que os frascos tivessem alguma superfície exposta ao ar, por razões de respiração do predador utilizado, como se pode visualizar na figura. Assim, foram minimizadas as diferenças de temperatura entre predadores, estando todos sob as mesmas condições no início da experiência, no quarto dia, em cada um dos locais.



Figura 8 - Predadores isolados durante 42 h com mistura oxigenada de água filtrada e canalizada - fotografia da experiência em Peñalara

Na manhã do quarto dia de amostragem foram selecionadas as espécies de presas com maior abundância em cada local, de acordo com a pré-seleção. Apesar de ocorrerem muitos macroinvertebrados que se constituem como presas nestes sistemas artificiais, sendo a abordagem da maioria dos estudos (p. ex. Weterings *et al.*, 2015), a seleção foi baseada em zooplâncton. As razões desta escolha foram associadas à elevada abundância deste grupo, permitindo perfazer os diferentes tipos de densidades, sendo atualmente o foco de determinados estudos (p. ex. Sentis *et al.*, 2015; Ingram & Burns, 2018). As presas selecionadas foram, então, recolhidas de um mesocosmo não aquecido, de forma semelhante à recolha de predadores, sendo colocadas num frasco de 1 L com água filtrada do seu local de origem. Seguidamente, o conteúdo deste frasco foi disposto num tabuleiro, o que facilitou a contagem (com contador de metal) e transferência (com pipeta) das diferentes densidades de presas para as arenas experimentais etiquetadas. Sempre que possível, houve algum cuidado na recolha de presas com tamanho similar, sendo dada preferência às de maiores dimensões. As arenas continham também uma mistura de água filtrada do local de origem dos organismos (anteriormente recolhida

noutro frasco de 1 L) com água canalizada, até aproximadamente 100 ml (com marcação). As arenas com as respectivas densidades (8, 16, 32, 64 e 128, sendo apenas 8 e 128 da temperatura ambiente e as densidades restantes comuns aos dois tratamentos) foram, por último, introduzidas nos tabuleiros de predação segundo o desenho experimental (Figura 9).

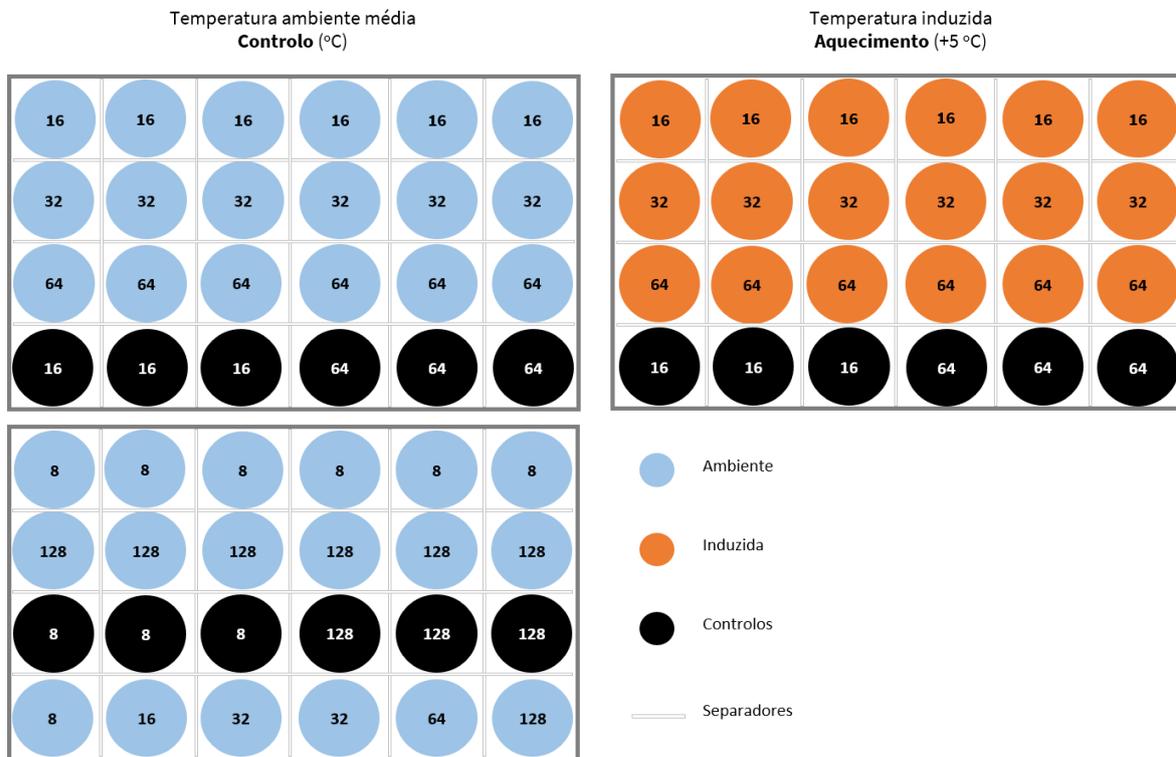


Figura 9 - Esquema representativo do desenho experimental com dois tabuleiros para predação sob temperatura ambiente média e um tabuleiro para a temperatura induzida. Os números representam as diferentes densidades nas arenas experimentais separadas entre si e distinguidas com a coloração preta para os controlos e azul e laranja para eventos de predação, sob temperatura ambiente e induzida, respetivamente

Previamente à colocação gradual dos frascos com predadores nas arenas, confirmou-se que estes estavam vivos. Os frascos de predadores foram, então, introduzidos nas arenas, exceto nas arenas de controlo e em Toledo, até ao início da experiência (1 h como período de aclimação). Em Toledo, os predadores que se encontravam dispersos no tabuleiro foram inseridos um a um nos frascos de predadores antes da colocação nas arenas. Estes frascos apresentavam um número e este foi registado na folha de campo, permitindo a devolução de cada indivíduo ao mesocosmo original no final da experiência.

A experiência de predação iniciou-se com a introdução gradual do conteúdo do frasco de predadores nas arenas experimentais (aprox. 30 s para densidades inferiores e 1 min para densidades elevadas, compensando a contagem final das presas, visto que densidades maiores requereram mais tempo). Assim, cada arena continha um predador com a respetiva densidade de presas ao longo da experiência, com duração de 6 h (de acordo com o último ensaio do estudo-piloto como referência ao presente estudo). No final da experiência, as arenas foram retiradas uma a uma, para a contagem de presas (vivas e mortas), sendo registados estes valores. Na contagem das presas consideradas mortas seguiu-se um critério de imobilidade e perda de coloração corporal. A contagem das presas foi efetuada no final e não no decorrer da experiência (contrariamente ao estudo-piloto) para todos os locais com exceção de Múrcia. Em Múrcia foi possível perceber que, apesar das contagens serem realizadas por dois observadores para minimizar o erro, tornou-se muito difícil medir com precisão as densidades elevadas. Deste modo, foram eliminadas as contagens intermédias nos restantes locais, tendo em conta que o estudo-piloto mostrou a mesma tendência nas diferentes horas.

Após os ensaios de predação, todos os organismos vivos foram devolvidos aos respetivos mesocosmos. O procedimento de contagem foi realizado em todas as áreas de estudo, exceto em Toledo, dadas as reduzidas dimensões das presas (difíceis de visualizar a olho nu). Estas foram preservadas em lugol em tubos *Falcon* de 50 ml para posterior contagem em laboratório. No início e final das experiências de predação foram ainda realizados outros procedimentos, tais como: medições de temperatura e oxigénio com leitor multiparamétrico HQ40D (Hach) (em três arenas experimentais por tabuleiro, de forma aleatória e distribuída), analisando se o sistema de aquecimento funcionava corretamente; obtenção de fotografias de todas as arenas, tabuleiros e monitores para registo. As arenas experimentais foram novamente fotografadas, uma a uma, à medida que se efetuou a contagem de presas. Nesta fase foi colocada uma folha de papel milimétrico impermeabilizada sob cada arena, o que conferiu uma escala a cada fotografia, auxiliando a medição dos predadores com o ImageJ (Figura 10).

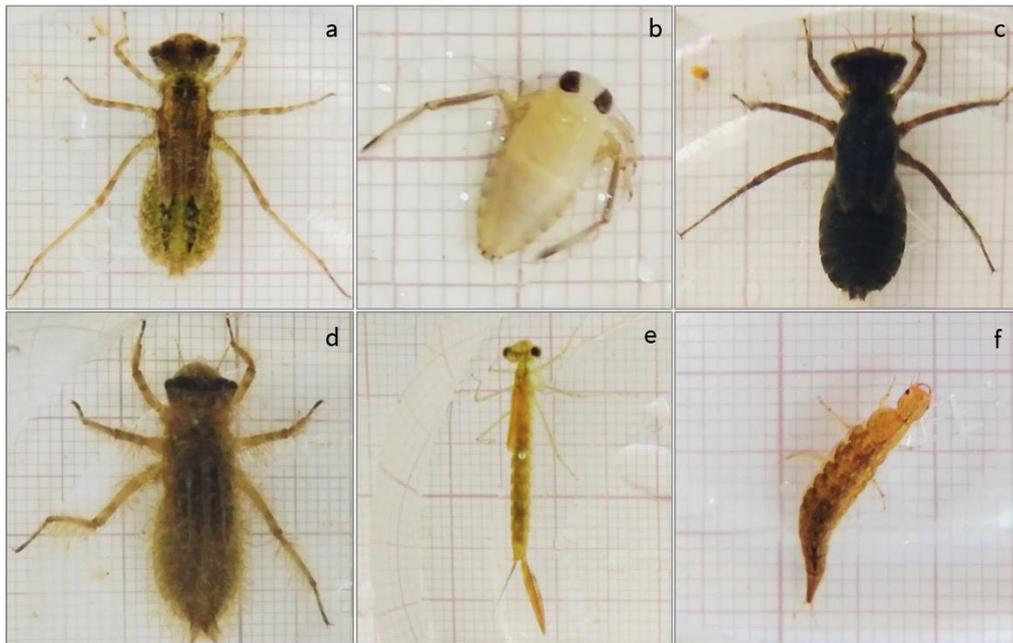


Figura 10 - Exemplar do predador sobre papel milimétrico (escala) de cada um dos locais (Múrcia - *S. fonscolombii* (a), Toledo - *Notonecta* sp. (b), Évora - *C. erythraea* (c), Porto - *L. quadrimaculata* (d), Jaca - *L. barbarus* (e) e Peñalara - *Agabus* sp. (f))

Terminado o período de amostragem, os predadores considerados mortos em cada uma das experiências (dois exemplares por local, à exceção de Évora que foram três e Jaca em que não morreu nenhum indivíduo), por razões desconhecidas, foram identificados em laboratório (em Jaca foram identificadas exúvias de indivíduos que mudaram durante a experiência). Foi utilizado um critério de imobilidade e a identificação ocorreu apenas nestes exemplares para evitar danificar e/ou matar mais indivíduos. Esta identificação com microscópio permitiu confirmar a classificação de cada um dos predadores envolvidos, sempre que possível até à espécie (no caso dos predadores da ordem Odonata). No que diz respeito às espécies de presas, estas foram identificadas por um especialista de zooplâncton diretamente no campo (no caso de Toledo, as presas foram contabilizadas em laboratório, tendo sido estimada a proporção de cada uma das duas espécies presentes). Os pares de interação de cada local encontram-se devidamente identificados na Tabela 2.

Tabela 2 - Espécies e gêneros de predadores e presas envolvidos nas experiências de predação nas seis áreas de estudo (pares de interação com respetiva abreviatura), assim como a proporção das presas envolvidas em Toledo e estado de desenvolvimento dos indivíduos deste local e de Peñalara

Local	Predadores	Presas
Múrcia	<i>Sympetrum fonscolombii</i> (Symfon) (Odonata: Libellulidae)	<i>Daphnia magna</i> (Damag) (Cladocera: Daphniidae)
Toledo	<i>Notonecta</i> sp. (Notone, juvenis) (Hemiptera: Notonectidae)	<i>Ceriodaphnia quadrangula</i> (Cequa) - 75 % <i>Moina brachiata</i> (Mobra) - 25 % (Cladocera: Daphniidae) (Cladocera: Moinidae)
Évora	<i>Crocothemis erythraea</i> (Croery) (Odonata: Libellulidae)	<i>Daphnia longispina</i> (Dalon) (Cladocera: Daphniidae)
Porto	<i>Libellula quadrimaculata</i> (Libqua) (Odonata: Libellulidae)	<i>Daphnia pulicaria</i> (Dapul) (Cladocera: Daphniidae)
Jaca	<i>Lestes barbarus</i> (Lesbar) (Odonata: Lestidae)	<i>Simocephalus vetulus</i> (Sivet) (Cladocera: Daphniidae)
Peñalara	<i>Agabus</i> sp. (Agabus, larvas) (Coleoptera: Dytiscidae)	<i>Daphnia pulicaria</i> (Dapul) (Cladocera: Daphniidae)

Das medições dos predadores efetuadas para cada local (54 indivíduos fotografados no final de cada experiência com exceção na de Jaca que foram 28), após a conversão do tamanho corporal em biomassa (mm para mg), foram obtidas as biomassas médias individuais destes. Esta conversão foi realizada com base nas fórmulas de tamanho-biomassa presentes na Tabela 3.

Tabela 3 - Fórmulas de tamanho-biomassa consideradas para obter a biomassa média de cada predador. Os parâmetros correspondentes à família apresentada na fonte foram ajustados a cada local (para Múrcia, Évora e Porto houve correspondência com a família do predador, mas para Toledo, Jaca e Peñalara foram escolhidos parâmetros de famílias com tamanho e forma similares)

Local	Fórmula (mg)	Família	Espécie utilizada	Fonte
Múrcia	$((0.0076 * \text{comprimento}) ^ 2.809) * 1000$	Libellulidae	<i>S. fonscolombii</i>	
Toledo	$((0.0031 * \text{comprimento}) ^ 2.904) * 1000$	Corixidae	<i>Notonecta</i> sp.	
Évora	$((0.0076 * \text{comprimento}) ^ 2.809) * 1000$	Libellulidae	<i>C. erythraea</i>	Benke <i>et al.</i> (1999)
Porto	$((0.0076 * \text{comprimento}) ^ 2.809) * 1000$	Libellulidae	<i>L. quadrimaculata</i>	
Jaca	$((0.0051 * \text{comprimento}) ^ 2.785) * 1000$	Coenagrionidae	<i>L. barbarus</i>	
Peñalara	$((0.0053 * \text{comprimento}) ^ 2.875) * 1000$	Baetidae	<i>Agabus</i> sp.	

Quanto à biomassa média das presas, esta foi obtida com base nos parâmetros de Dumont *et al.* (1975) para a conversão do tamanho em biomassa das presas amostradas em cinco mesocosmos do local considerado. Para este procedimento foram considerados os tamanhos de cada espécie de presa da amostragem de 2018, pela razão de que nos ensaios não foi possível medir o tamanho das presas. Em seguida, foi calculada a biomassa média consumida mediante a multiplicação da biomassa média de cada presa pelo número de presas consumidas por arena. Posto isto, foram representadas as biomassas médias das presas consumidas em função das biomassas médias individuais dos predadores, bem como os respetivos erros-padrão com regressão logística (Figura 11 e Tabela 4).

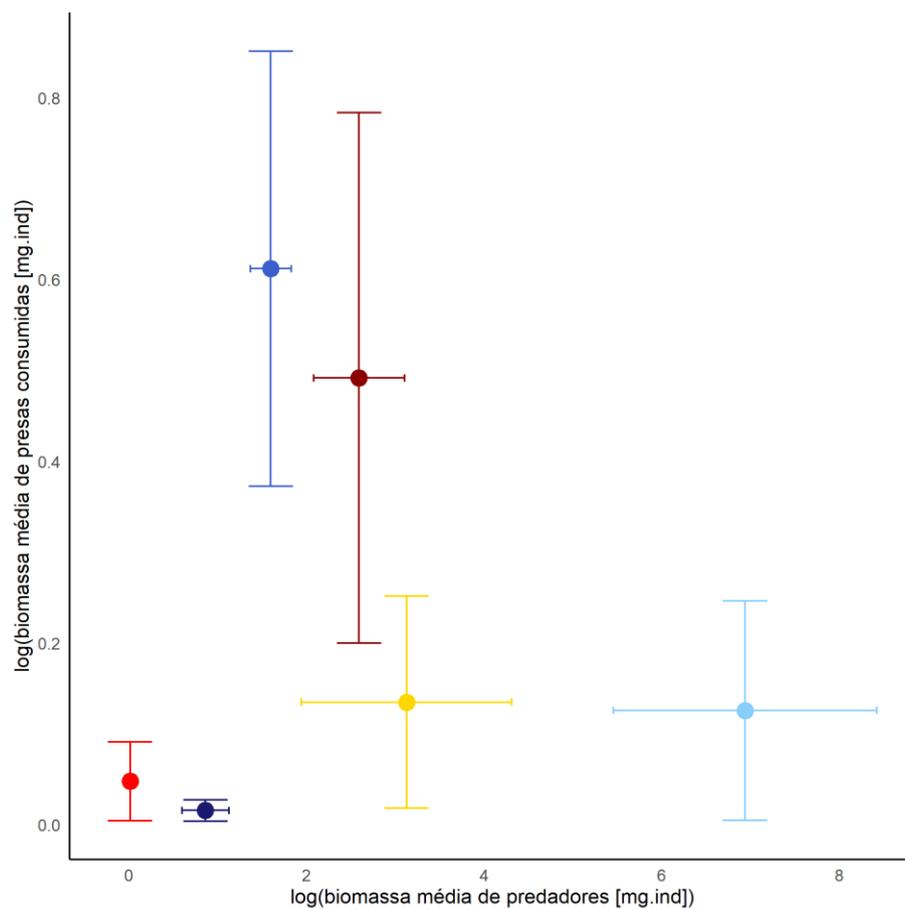


Figura 11 - Biomassa média das presas consumidas em função da biomassa média dos predadores e erros-padrão dos seis locais. O esquema de cores representa o gradiente térmico dos seis locais: Múrcia (vermelho escuro), Toledo (vermelho), Évora (amarelo), Porto (azul claro), Jaca (azul ciano) e Peñalara (azul escuro)

Tabela 4 - Biomassa média de cada predador e biomassa média consumida por local com os respectivos erros-padrão de cada uma das biomassas

Local	Biomassa média predador ± Erro-padrão (mg.ind)	Biomassa média consumida ± Erro-padrão (mg.ind)
Múrcia	2.591 ± 0.510	0.492 ± 0.292
Toledo	0.014 ± 0.007	0.048 ± 0.043
Évora	3.125 ± 1.182	0.135 ± 0.117
Porto	6.937 ± 1.482	0.126 ± 0.121
Jaca	1.597 ± 0.230	0.612 ± 0.239
Peñalara	0.862 ± 0.264	0.016 ± 0.012

2.7. Análise estatística

Após a obtenção dos dados experimentais, foi efetuado o processamento dos mesmos, onde se procedeu à análise estatística no programa R (R Core Team, 2019). Foi realizado um procedimento de análise baseado no modelo de Rogers (1972) que se encontra descrita em Poley *et al.* (2018), que tem em conta a depleção de presas durante as experiências de predação, isto é, não há reposição das densidades iniciais ao longo das 6 horas. Nesta análise, a intensidade das interações nos diferentes tratamentos foi relacionada com a distribuição dos organismos mediante três fases (seleção, ajuste e comparação dos tipos de resposta funcional em sistemas de predador-presa; ver detalhes nos parágrafos seguintes). As três fases encontram-se descritas em Pritchard *et al.* (2017) e como exemplo de um pacote do R que aborda esta metodologia é o desenvolvido por Pritchard (2017), o qual foi seguido para a realização das análises estatísticas do estudo. Para tal, foram também utilizados os pacotes *bbmle* (Bolker & R Development Core team, 2017) e *stats4* (base do R).

As análises efetuadas permitiram comparar as duas temperaturas em estudo, tendo sido realizados ajustes ao longo das três fases mencionadas:

a) Seleção de modelos - fase em que foi atribuído um tipo de resposta funcional a cada local e realizada uma otimização MLE (ajuste polinomial). Esta fase permite uma apreciação inicial do tipo de resposta de cada ensaio e, desse modo, permite delinear os passos seguintes no que diz respeito ao tipo de modelos a utilizar para ajustar a curva aos dados.

b) Ajuste de modelos - fase em que os coeficientes foram ajustados ao tipo de resposta apropriada (tipos II ou III) e neste caso foi considerado o protocolo de ajuste do modelo de Juliano (2001). Este protocolo utiliza uma equação logística de 3ª ordem polinomial para modelar a relação entre o número de presas consumidas e a densidade inicial de presas. Se a forma cúbica não fosse adequada (isto é, resultado não significativo), o modelo era reajustado para uma ordem inferior, através da remoção do parâmetro P_3 , mantendo os restantes parâmetros P_0 , P_1 e P_2 (Juliano, 2001; Poley *et al.*, 2018). A determinação de cada parâmetro foi obtida através de regressão logística da proporção de presas consumidas (N_e/N_0) em função da densidade inicial de presas (N_0). O ajuste do modelo dependeu do nível de significância das estimativas, tendo em conta que, um valor significativo para o coeficiente linear (P_1) foi atribuído a uma resposta funcional de tipo III, enquanto um valor significativo de P_0 foi associado a uma resposta de tipo II. Quando P_0 e P_1 não apresentavam qualquer nível de significância, reajustava-se o modelo, de modo a testar a resposta funcional de tipo I. Com a função *nls* foram obtidas respostas funcionais de tipo II e III e com a *lm* de tipo I. A equação do modelo considerado é a seguinte (Equação 1):

$$\frac{N_e}{N_1} = \frac{\exp(P_0 + P_1 * N_0 + P_2 * N_0^2 + P_3 * N_0^3)}{(1 + \exp(P_0 + P_1 * N_0 + P_2 * N_0^2 + P_3 * N_0^3))}$$

onde, P_0 , P_1 , P_2 e P_3 são os coeficientes de interseção, linear, quadrático e cúbico, respetivamente (Poley *et al.*, 2018).

c) Comparação de coeficientes ajustados - fase em que foram realizadas múltiplas estimativas de curvas e parâmetros com 95 % de confiança, sendo obtidos polígonos que mostram a distribuição de curvas possíveis com a menor distância à reta estimada. Nesta fase, as curvas foram ajustadas para determinar a taxa de consumo em função da densidade inicial das presas, definindo cada resposta funcional através do ajuste da equação de Holling. Foram assumidas respostas de tipo II, obtidas comumente em experiências laboratoriais e, quando necessário, foram efetuados ajustes para obter as restantes respostas. Ao longo deste estudo algumas densidades de presas foram esgotadas sem que houvesse reposição das mesmas, logo o modelo apropriado para ajustar as curvas de certos locais foi o modelo de Rogers, em que a equação é a seguinte (Equação 2):

$$N_e = N_0 * [1 - \exp(a(Th * N_e - a))]$$

onde, a e Th constituem a taxa de captura instantânea do recurso (taxa de ataque) e o tempo gasto a ingerir e a digerir o mesmo ao longo da experiência, respetivamente; q é um expoente que altera o tipo de resposta funcional de uma curva de tipo II para tipo III (tipo II, $q = 0$ e tipo III, $q > 0$). A assíntota da curva é representada por $1/Th$ (Rosenbaum & Rall, 2018).

Nestas análises foram atribuídos valores aos parâmetros a e Th para cada tratamento, efetuando análises com as duas equações, verificando a que melhor se adequava através do critério AIC e da significância dos parâmetros. Para a obtenção dos gráficos foram utilizados os pacotes *ggpubr* (Kassambara, 2019), *knitr* (Xie, 2019), *ggplot2* (Wickham, 2016), *magrittr* (Bache & Wickham, 2014) e *plyr* (Wickham, 2011). Algumas das funções utilizadas foram as seguintes: *ddply* (*plyr*), *sd* (*stats*), *aes* (*ggplot2*), *ggarrange* (*ggpubr*). Foram ainda, calculadas as médias e os erros-padrão da média para cada tratamento. Para alguns locais foi necessário efetuar novamente ajustes lineares com a função *lm* e procedeu-se à criação de objetos para planejar determinados ajustes e descrever funções. Por último, na análise de comparação dos tratamentos, foi implementado um teste de diferença com a hipótese nula de que os parâmetros ajustados não diferiam (Da e Dh estimaram as diferenças entre as taxas de captura e os tempos de manipulação dos predadores entre os vários tratamentos). Deste modo, foram obtidos gráficos finais com representação de polígonos que representam uma melhor estimativa do tipo de resposta funcional de cada uma das áreas em estudo, após a realização de ajustes logísticos e ecológicos.

3. Resultados

3.1. Ajuste de modelos

Da fase de ajuste de modelos foram obtidos os tipos de resposta funcional e o respetivo nível de significância para os dois tratamentos de cada local (Tabela 5), estando representados apenas os valores mais significativos, com base no parâmetro $P1$ para o teste t para as respostas de tipo II e III, sendo anotado o valor de $P0$ significativo para uma resposta de tipo II e de $P1$ para uma de tipo III. Para a resposta de tipo I, foram registados os valores significativos e os valores sem nível de significância.

Tabela 5 - Análises estatísticas para os dois tratamentos com o tipo de resposta em cada local, segundo a fase de ajuste de modelos (pacote *stats*). Valor de p : '***' $p < 0.001$, '**' $p < 0.05$, '.' $p < 0.1$

Tratamento	Local	Função	Correlação	t	Pr(> t)	Resposta	Sig.
Controlo	Múrcia	<i>nls</i>		$P1: -2.751$	$P0: 0.000215$	Tipo II	***
	Toledo	<i>lm</i>	0.04298	-1.604	0.118	S/ relação	
	Évora		0.1166	-2.37	0.0236	Tipo I	*
	Porto	<i>nls</i>		$P1: -3.851$	$P0: 0.0000155$	Tipo II	***
	Jaca			$P1: -1.892$	$P1: 0.0793$	Tipo III	.
	Peñalara		<i>lm</i>	-0.01547	-0.683	0.4991	S/ relação
Aquecimento	Múrcia	<i>lm</i>	0.05208	-1.391	0.183	S/ relação	
	Toledo	<i>nls</i>		$P1: -2.233$	$P1: 0.0412$	Tipo III	*
	Évora	<i>lm</i>	0.2709	-2.705	0.015619	Tipo I	
	Porto		-0.04766	-0.476	0.640	S/ relação	
	Jaca		0.7367	-5.383	0.000443	Tipo I	***
	Peñalara		0.2482	-2.571	0.0205		*

Os resultados obtidos para os tratamentos de controlo nos seis locais foram os seguintes: *Múrcia* e *Porto* - os resultados sugerem respostas funcionais de tipo II com valores positivamente significativos para $P0$, isto é, $p < 0.001$ (*Múrcia*: $t_{33} = -2.75$; *Porto*: $t_{33} = -3.85$); *Toledo* e *Peñalara* - os resultados indicam que não há relação entre o número de presas consumidas e a densidade de presas, após análise linear (*Toledo*: $F_{1,34} = 2.57$, $p = 0.12$, $r^2 = 0.04$; *Peñalara*: $F_{1,34} = 0.47$, $p = 0.50$, $r^2 = -0.02$); *Évora* - os resultados evidenciam uma resposta de tipo I significativa com equação linear, em que $p < 0.05$ ($F_{1,34} = 5.62$, $p = 0.024$, $r^2 = 0.12$); *Jaca* - os resultados mostram uma resposta funcional de tipo III significativa para $P1$ com $p < 0.1$ ($t_{14} = -1.89$, $p = 0.08$).

Relativamente aos resultados obtidos para os tratamentos de aquecimento nos seis locais foram os seguintes: *Múrcia* e *Porto* - os resultados sugerem que não há relação entre o número de presas consumidas e a densidade das mesmas, após análise utilizando um modelo linear (*Múrcia*: $F_{1,16} = 1.93$, $p = 0.18$, $r^2 = 0.05$; *Porto*: $F_{1,16} = 0.23$, $p = 0.64$, $r^2 = -0.05$); *Toledo* - os resultados indicam uma resposta de tipo III com $P1$ significativo, isto é, $p < 0.05$ ($t_{15} = -2.23$, $p = 0.04$); *Évora*, *Jaca* e *Peñalara* - os resultados mostram uma resposta funcional de tipo I, em que os três locais detêm valor significativo, com $p < 0.001$ para *Jaca* e $p < 0.05$ para *Évora* e *Peñalara* (*Évora*: $F_{1,16} = 7.32$, $p = 0.02$, $r^2 = 0.27$; *Jaca*: $F_{1,9} = 28.98$, $r^2 = 0.74$; *Peñalara*: $F_{1,16} = 6.61$, $p = 0.02$, $r^2 = 0.25$).

Para a obtenção destes resultados foi necessário efetuar um ajuste inicial, removendo o parâmetro $P3$ (coeficiente cúbico da ordem polinomial para que $P1$ fosse

significativo). Para certos casos em que a remoção deste parâmetro não permitiu obter resultados significativos, indicando que o ajuste não foi suficiente para explicar os dados (função polinomial não apropriada), foi efetuada uma análise linear para uma resposta funcional de tipo I.

3.2. Ajuste de equações

Na fase de ajuste das equações de resposta funcional foram obtidos resultados para os tratamentos de cada local relativamente ao modelo mais apropriado (testes de Holling e Rogers) e respetiva significância, de acordo com os valores dos parâmetros a e Th e o valor do critério AIC (critério de informação de Akaike) (Tabela 6). Foram registados apenas os valores dos modelos considerados mais apropriados, tendo em conta o menor valor do critério de AIC e/ou o nível de significância dos parâmetros estimados, sendo esta escolha variada consoante o local.

Tabela 6 - Análises estatísticas para os dois tratamentos com o tipo de modelo considerado em cada local, com base nos valores do critério AIC e nível de significância (pacote *stats* e função *nls*). As estimativas dos coeficientes a e Th foram reportadas quando os parâmetros se evidenciavam significativos. Valor de p : '****' $p < 0.001$, '***' $p < 0.01$, '**' $p < 0.05$

Tratamento	Local	Modelo	AIC	Parâm.	Coef.	t	Pr(> t)	Sig.
Controlo	Múrcia	Rogers	258.81	a	1.0233	6.834	7.27E-08	***
				Th	0.0060	15.472	< 2E-16	
	Toledo	Rogers	266.63	a	0.5717	4.676	4.50E-05	***
				Th	0.0059	9.343	6.46E-11	
	Évora	Rogers	289.17	a	0.4905	3.024	0.004719	**
				Th	0.0049	3.747	0.000665	
	Porto	Holling	304.19	a	0.9514	2.231	0.03238	*
				Th	0.0203	2.971	0.00542	
	Jaca	Holling	124.09	a	1.6483	3.264	0.00523	**
				Th	0.0199	5.880	3.03E-05	
	Peñalara	Holling	167.19	a		1.427	0.163	
				Th		0.781	0.44	
Aquecimento	Múrcia	Holling	131.06	a	0.2324	3.068	0.00736	**
				Th		0.941	0.36059	
	Toledo	Holling	134.81	a		1.416	0.176	
				Th		-0.194	0.849	
	Évora	Rogers	135.57	a	1.0072	2.878	0.0109	*
				Th	0.0152	15.482	4.75E-11	
	Porto	Holling	145.76	a		1.299	0.212	
				Th		-0.330	0.746	
	Jaca	Holling	69.08	a	1.2937	5.716	0.000288	***
				Th	0.0096	3.607	0.005689	
	Peñalara	Rogers	102.02	a	0.1920	2.192	0.0435	*
				Th	0.0131	5.216	8.48E-05	

Os modelos escolhidos para o tratamento de controle para cada um dos locais foram os seguintes: Múrcia - ambas as equações revelam um bom ajuste, proporcionando estimativas significativas para ambos os parâmetros, contudo foi escolhido o modelo de Rogers, uma vez que os parâmetros apresentavam valor significativo, isto é, $p < 0.001$, apesar do maior valor de AIC (258.81); Toledo e Évora - nestes locais o modelo de Rogers também possibilita melhor ajuste e os parâmetros são muito significativos. Em Toledo, ambos os parâmetros são bastante significativos, apesar do valor de AIC ser superior neste teste (266.63, $p < 0.001$), enquanto em Évora, os parâmetros a e Th têm diferentes níveis de significância ($p < 0.01$ e $p < 0.001$, respetivamente) com valor de AIC de 289.17; Porto, Jaca e Peñalara - nestes locais o modelo de Holling providencia uma melhor estimativa dos parâmetros, dado o menor valor para o critério de AIC em cada um deles, ainda que este teste apresente menores valores para os níveis de significância face ao modelo de Rogers (Porto: 304.19, a com $p < 0.05$ e Th com $p < 0.01$; Jaca: 124.09, a com $p < 0.01$ e Th com $p < 0.001$; Peñalara: 167.19, parâmetros a e Th não são significativos).

Os modelos escolhidos para o tratamento de aquecimento para cada um dos locais foram os seguintes: Múrcia - foi escolhido o modelo de Holling, uma vez que o parâmetro a é significativo ($p < 0.01$), embora o valor de AIC seja superior (131.06); Toledo e Porto - nenhuma das equações é capaz de fornecer estimativas significativas dos parâmetros, contudo se for necessário escolher uma, a equação de Holling providencia melhor ajuste, uma vez que os valores dos parâmetros e do AIC são inferiores aos do teste de Rogers (Toledo: 134.81; Porto: 145.76); Jaca - neste local, as equações providenciavam ajustes similares, tendo sido escolhida a de Holling por conferir nível de significância superior a ambos os parâmetros (a com $p < 0.001$ e Th com $p < 0.01$). Todavia, a equação de Rogers apresentava menor valor de AIC do que a equação escolhida com 69.08; Évora e Peñalara - a equação escolhida para estes locais foi a de Rogers, dado que os parâmetros foram significativos e os valores de AIC inferiores, resultando num melhor ajuste (Évora: 135.57; Peñalara: 102.02, onde a com $p < 0.05$ e Th com $p < 0.001$ comum aos dois).

Quanto aos parâmetros, o parâmetro a (taxa de ataque) varia de local para local, sobretudo na temperatura ambiente, com valor mais alto em Jaca (1.65) e o mais baixo em Évora (0.49). No que diz respeito ao Th (tempo de manipulação), o maior valor foi

verificado no Porto (0.02) e o menor em Évora (0.00), de acordo com a Tabela 4. No tratamento de aquecimento foram verificados poucos resultados significativos, mas nestes pode ser evidenciada uma redução substancial dos valores dos parâmetros para Múrcia e Jaca (Múrcia com apenas a de 0.23 e Jaca com 1.29 e 0.01 para a e Th , respetivamente). O oposto foi mostrado em Évora, sendo verificado um aumento dos dois parâmetros (a com 1.01 e Th com 0.02), evidente na Figura 12. Estas comparações foram efetuadas apenas para modelos significativos nas duas temperaturas, o que dificulta a comparação de todos os locais.

No final das análises foram realizadas estimativas da assíntota para cada tratamento com o teste mais adequado, de acordo com o valor de AIC apresentado, considerando que um melhor ajuste está associado ao menor valor deste critério.

3.3. Ajuste logístico de dados e obtenção de gráficos

A comparação entre os dois tratamentos (controlo e aquecimento) em cada um dos seis locais de estudo (seis gráficos) encontra-se representada na Figura 12. É possível verificar que os controlos (a azul) de todos os locais possuem uma tendência positiva, embora esta seja mais acentuada em Múrcia, Porto e Jaca (com consumo médio superior a 30 presas), o que não se visualiza nos restantes locais. Relativamente ao tratamento de aquecimento, os locais que denotam tendência positiva são Múrcia, Toledo e Jaca, enquanto Évora, Porto e Peñalara respondem negativamente. Assim, para metade dos locais, a taxa de consumo de presas foi superior no tratamento de aquecimento, aumentando ao longo dos níveis de densidade. Em Jaca, este aumento foi mais acentuado face a Múrcia e Toledo, com aproximadamente 100 presas consumidas na densidade mais elevada, o que faz sentido tendo em conta o maior valor obtido para o parâmetro a . Por outro lado, no Porto foi observado o maior erro-padrão, precisamente no nível mais alto de densidade, tendo existido muitas discrepâncias entre replicados. Este erro-padrão deve-se provavelmente a uma maior variabilidade entre os indivíduos em termos de tamanho corporal.

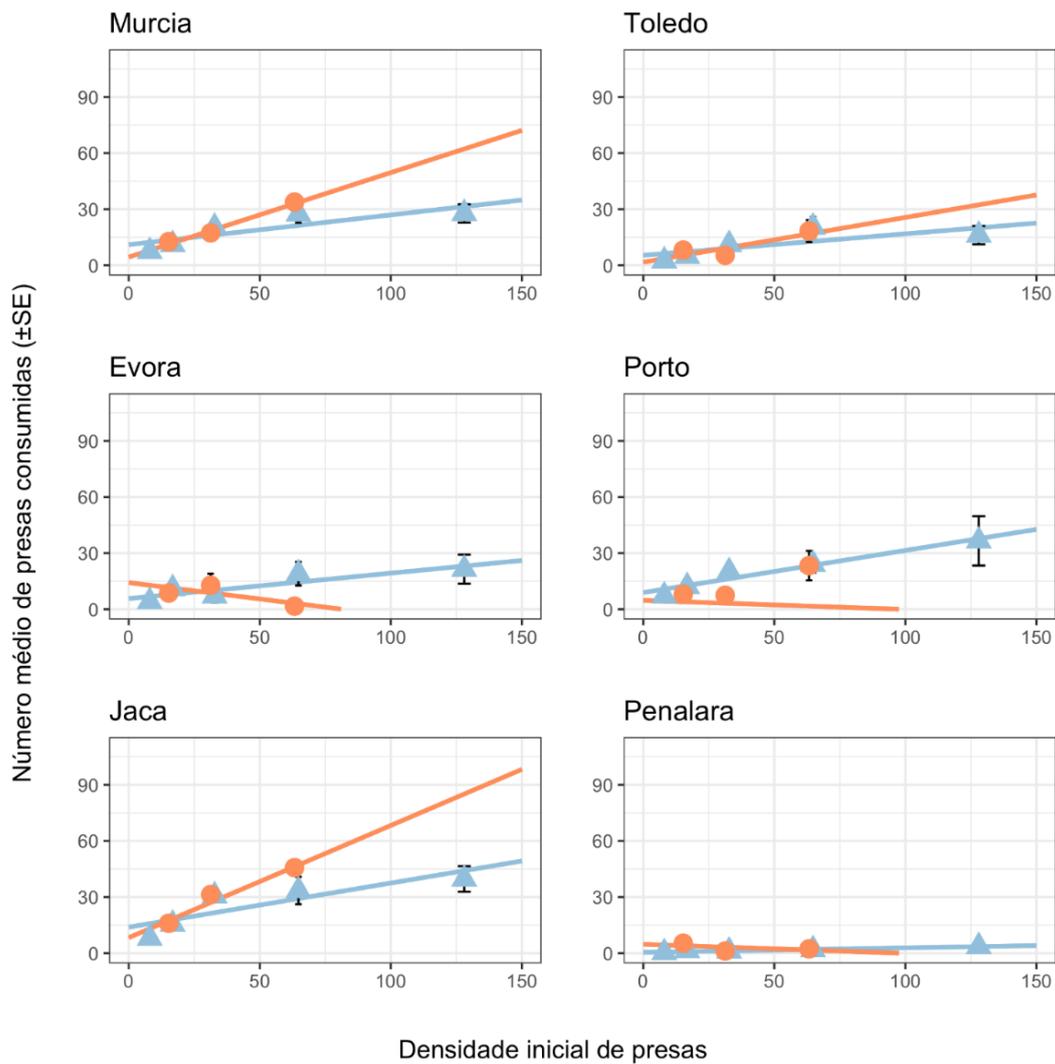


Figura 12 - Número médio de presas consumidas em função da densidade inicial de presas. Representação do tratamento de controlo (retas e triângulos a azul) e do tratamento de aquecimento (retas e círculos a laranja) com erros-padrão das seis áreas de estudo

As curvas de resposta funcional dos tratamentos de controlo nos seis locais (Figura 13) estão representadas segundo o gradiente térmico (ver secção da “Instalação experimental Iberian Ponds” e das “Áreas de estudo” na metodologia). Verificaram-se diferenças entre os predadores de cada local, revelando alguma coerência. Os locais com maior taxa de consumo foram Jaca, Porto e Múrcia e, por sua vez, Évora, Toledo e Peñalara com menor número de presas consumidas. Em Jaca foi verificada uma resposta funcional de tipo III, no Porto e em Múrcia existe uma interação de tipo II e em Évora de tipo I, não existindo relação estatística enquadrada numa das três curvas descritas para Toledo e Peñalara.

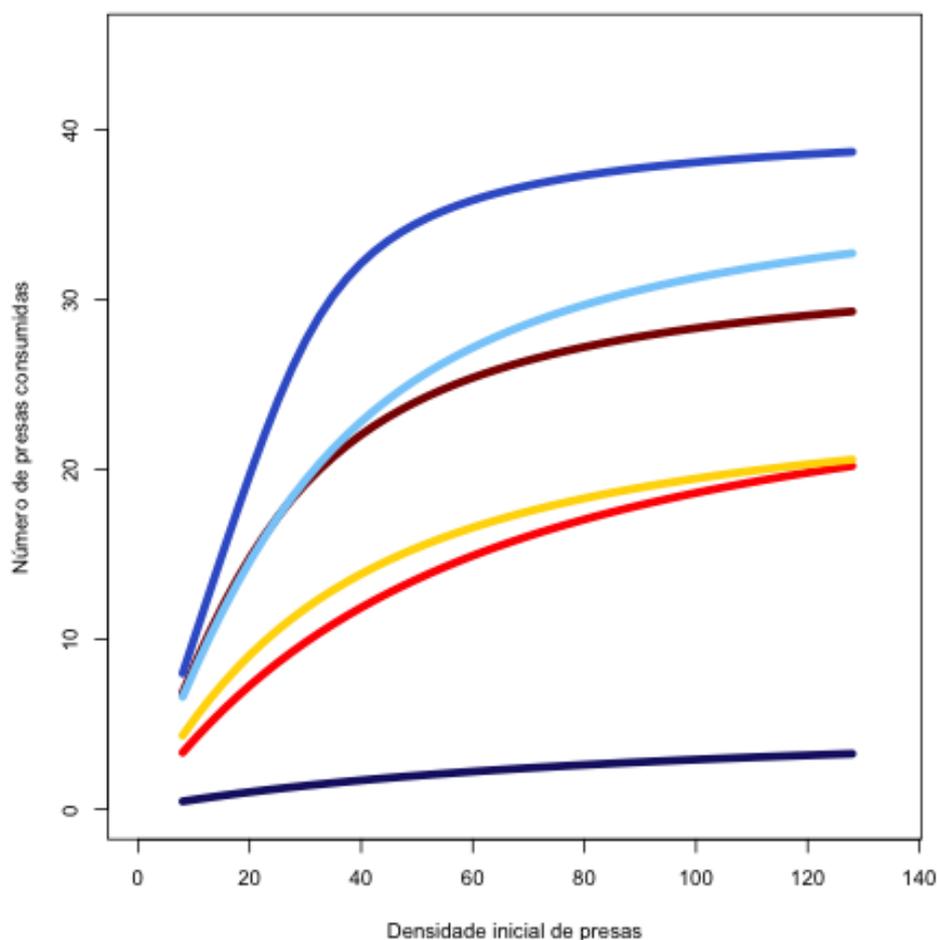


Figura 13 - Curvas de resposta funcional obtidas no tratamento de controlo (temperatura ambiente média) das seis áreas de estudo. O esquema de cores representa o gradiente térmico dos seis locais: Múrcia (vermelho escuro), Toledo (vermelho), Évora (amarelo), Porto (azul claro), Jaca (azul ciano) e Peñalara (azul escuro)

3.4. Ajuste ecológico de dados e comparação de polígonos

Por fim, a Figura 14 evidencia os polígonos estimados para os seis locais, após seleção, ajuste e comparação. Os polígonos obtidos para cada tratamento correspondem a múltiplas estimativas de curvas e parâmetros que se aproximam da reta estimada. Todos os locais mostram alguma evidência para uma resposta funcional de tipo II quando testados com o pacote *frair*, exceto Peñalara na temperatura ambiente e Toledo e Porto na temperatura induzida (Anexo II Tabela 1).

Relativamente aos controlos (arenas sem a presença do predador) foram utilizados para verificar a mortalidade natural das presas em cada local. A mortalidade natural média foi de aproximadamente 40 indivíduos por local, sendo que no Porto foram detetados 186 indivíduos imóveis e sem coloração. Neste local observaram-se as maiores proporções de mortalidade, com mais de 25 % no tratamento de temperatura ambiente,

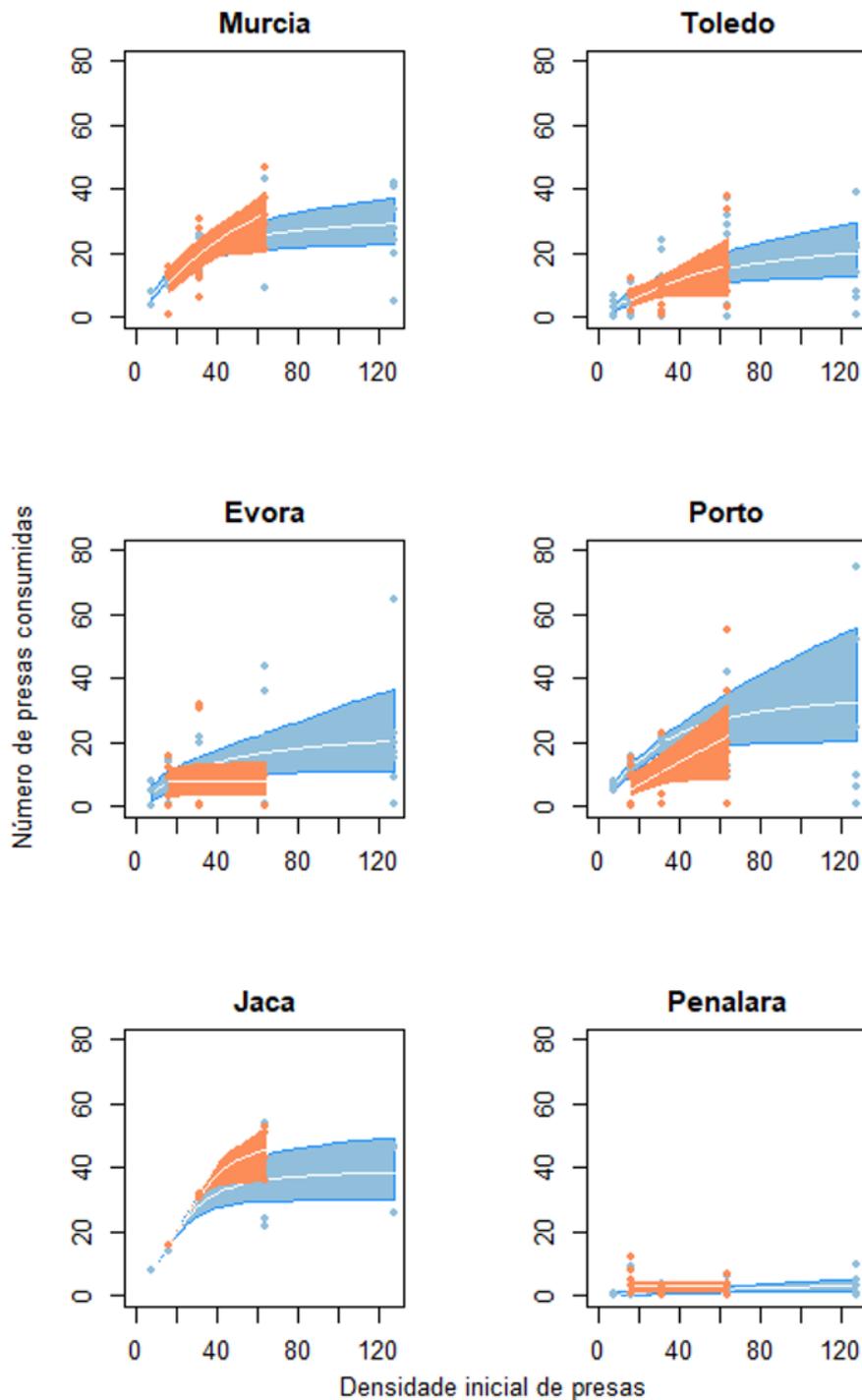


Figura 14 - Polígonos estimados do número de presas consumidas em função da densidade inicial de presas por local sob temperatura ambiente (a azul) e temperatura induzida (a laranja). O tamanho dos polígonos indica a variação entre os replicados de cada tratamento (quanto maior for a largura do polígono maior é a variabilidade existente)

nas seguintes densidades: 100 % na densidade 8 e cerca de 34 % na de 128. As razões para esta ocorrência são desconhecidas, uma vez que nos restantes locais esta taxa foi insignificante (proporção de presas mortas muito inferior a 25 %). Os controlos de Toledo não foram contabilizados, pela razão de que não foi possível ver as presas a olho nu e ao armazená-las em tubos *Falcon* com lugol, todas as presas morreram e não se

distinguiram as vivas das mortas como nos restantes locais. Em Jaca e Peñalara também não foi possível efetuar controlos para todas as densidades nem com o mesmo número de replicados que os restantes locais devido à falta de presas (densidades 16 e 64 com um replicado para cada tratamento). Em todos os locais, não foram realizados controlos para a densidade 32, pois já era possível ter uma perceção de quantas presas morriam naturalmente no espetro de densidades.

4. Discussão

O estudo das interações bióticas, nomeadamente entre predadores e presas, é essencial para compreender as consequências de diversas ameaças ecológicas que podem atuar em simultâneo com as alterações climáticas (p. ex. introdução de espécies e destruição de habitats) (Fordham, 2015; Jackson *et al.*, 2017; Weinbach *et al.*, 2017). Nesta dissertação foi possível quantificar diferentes interações com recurso a um sistema de aquecimento. E, tal como verificado noutros estudos (p. ex. Sentis *et al.*, 2012), os resultados confirmaram que as variações de temperatura afetam o metabolismo e o comportamento dos predadores, afetando a dinâmica das interações.

De acordo com os objetivos e hipóteses iniciais, verificou-se que as interações predador-presa entre tratamentos variaram de local para local, tendo sido obtidas respostas funcionais distintas. Algumas das taxas de consumo de presas foram afetadas pelos diferentes níveis de densidade, aumentando com o acréscimo do número de presas em certos locais com resposta funcional de tipo II. E ainda, alguns dos predadores aparentam ser mais especialistas em zooplâncton do que os restantes.

Resposta funcional por tratamento em cada local

Neste estudo, as respostas funcionais do tratamento de temperatura ambiente apresentaram resultados mais significativos face ao tratamento de temperatura induzida. Contudo, devido a constrangimentos experimentais resultantes da baixa abundância de alguns dos predadores, realizaram-se mais replicados no primeiro tratamento, o que pode explicar a obtenção de resultados mais consistentes do ponto de vista estatístico. No geral, cinco dos seis locais evidenciaram uma possível resposta funcional de tipo II sob temperatura ambiente (à exceção de Peñalara), ao invés do tratamento de aquecimento, em que apenas quatro apresentaram esta evidência

(excetuando Toledo e Porto). Assim, no primeiro caso, as taxas de consumo de presas mostraram uma tendência para aumentar com elevadas densidades de presas em todos os locais, o que apenas se verificou para metade dos locais no segundo caso.

Concretamente, de acordo com o modelo seguido na primeira fase da metodologia (ajuste de modelos), a resposta funcional de tipo II não foi obtida no tratamento de aquecimento, como alguns estudos mostraram (p. ex. Sentis *et al.*, 2017), sendo apenas observada em Múrcia e no Porto sob a temperatura ambiente média (com nível de significância elevado). Uma curva de tipo II ocorre quando a resposta aumenta a uma taxa decrescente até atingir o valor máximo (Hassell *et al.*, 2007) No tratamento de aquecimento de ambos os locais, não se observou relação estatística, logo não se verificou nenhum tipo de resposta funcional que se enquadrasse nas três curvas comuns descritas. Em Múrcia, a taxa de consumo no tratamento de aquecimento foi bastante superior, embora não o suficiente para a atribuição de um tipo I, por comparação de gráficos (neste caso o valor máximo é inferior). No Porto, a taxa de consumo neste tratamento foi bastante inferior, com tendência negativa (taxa de consumo superior na densidade baixa). A explicação para estes resultados pode estar relacionada com o limiar crítico de temperatura para diferentes espécies da ordem Odonata. Em Múrcia, o predador *S. fonscolombii* (Anisoptera) aparenta ser tolerante a temperaturas mais altas. Esta espécie encontra-se distribuída por locais com clima quente, como África e Ásia, e recentemente colonizou algumas partes da Europa (Dijkstra, 2018), provavelmente devido às alterações climáticas. No Porto, o predador *L. quadrimaculata* (Anisoptera) não parece tolerar aumentos de temperatura, uma vez que alterou o seu comportamento alimentar, estando melhor adaptado à temperatura ambiente. Apresentando, então, preferência por climas temperados.

Em Évora, foram obtidas respostas funcionais lineares (tipo I) significativas nas duas temperaturas testadas, o que indica uma tolerância similar a ambas as temperaturas, apesar de no aquecimento a taxa de consumo ser superior para densidades baixas. A curva de tipo I ocorre quando a resposta aumenta linearmente até um número máximo de presas consumidas por predador à medida que a densidade de presas aumenta (Hassell *et al.*, 2007). À semelhança de Évora, em Jaca foi também obtida uma resposta de tipo I significativa no tratamento de aquecimento, enquanto à

temperatura ambiente a resposta foi de tipo III (tendências positivas). A curva de tipo III ocorre quando a resposta é sigmoide e também há uma aproximação gradual da assíntota superior (Hassell *et al.*, 2007). Uma explicação para estas respostas pode ser o facto de durante os períodos de aclimação e da experiência alguns predadores terem efetuado mudas, aumentando o seu tamanho. Em Évora verificaram-se estes eventos durante o período de aclimação (dois indivíduos) e em ambos os tratamentos (dois indivíduos sob temperatura ambiente e um sob aquecimento). Neste local, observou-se ainda que os predadores apresentavam uma coloração diferente, em comparação com os do estudo-piloto (mesma espécie). Os indivíduos da espécie *C. erythraea* (Anisoptera), comumente, apresentam uma coloração verde (visualizada também nos indivíduos que efetuaram mudas) e durante o procedimento de captura apresentavam uma coloração preta. Isto, poderá estar associado a um grau de maturação avançado, o que terá dificultado a identificação dos exemplares. Todavia, em Jaca ocorreram apenas mudas durante a experiência (três indivíduos sob temperatura ambiente e um sob aquecimento). As razões para estes eventos terem ocorrido são desconhecidas, mas supõe-se que as temperaturas às quais os indivíduos da espécie *L. barbarus* (Zygoptera) foram submetidos foram favoráveis ao seu desenvolvimento. Por outro lado, os indivíduos poderiam já estar a preparar-se para esta ocorrência antes do procedimento de recolha.

Em Toledo e em Peñalara não se verificaram relações significativas do ponto de vista estatístico entre a taxa de consumo de presas e a densidade das mesmas nos replicados da temperatura ambiente. Por esta razão, não foi possível classificar a forma da curva como sendo do tipo I. Aos replicados do tratamento de aquecimento de Toledo foi atribuída uma resposta de tipo III, como verificado noutros estudos com este predador (p. ex. Hassell *et al.*, 2007), enquanto a de Peñalara foi de tipo I e ambas as respostas foram significativas. As taxas de consumo mais baixas foram observadas com os predadores *Notonecta* sp. (Hemiptera) e *Agabus* sp. (Coleoptera, no estado larvar), de Toledo e Peñalara, respetivamente.

Assim, o aquecimento contribuiu para um maior consumo de presas face à temperatura de controlo em metade dos locais, o que reforça a hipótese 1 (H1). Tal, vai de encontro a outros estudos, uma vez que o aquecimento, por norma, leva a uma maior

taxa de predação, dado que os predadores são mais eficientes na procura e manipulação das presas (Englund *et al.*, 2011; Sentis *et al.*, 2012; Herrera *et al.*, 2018). A taxa de consumo foi superior para níveis de densidade elevados em todos os tratamentos de temperatura ambiente e em metade dos tratamentos de aquecimento, o que corrobora a hipótese 2 (H2).

Taxa de captura e tempo de manipulação entre locais

Na temperatura ambiente foi observada uma maior taxa de captura (parâmetro a) em Jaca e menor em Évora, enquanto o tempo de manipulação (parâmetro Th) foi superior no Porto e igualmente menor em Évora. Relativamente à temperatura induzida, foram verificados poucos valores significativos. Ocorreu uma redução considerável nos valores dos parâmetros a e Th de Múrcia e Jaca face a Évora, com aumento significativo dos dois parâmetros. Desse modo, os valores obtidos não revelaram a mesma tendência da maioria dos estudos (p. ex. Sentis *et al.*, 2012), em que a taxa de captura tende a aumentar com o aquecimento, ao invés do tempo de manipulação que diminui. Contudo, o aumento na taxa de captura (isto é, aumento na velocidade de ataque) com o aquecimento, não se traduz necessariamente numa maior taxa de sucesso para o predador (Herrera *et al.*, 2018), dado que por vezes a presa consegue escapar.

Predadores e respetivas estratégias alimentares

Os diferentes tipos de resposta funcional associam-se à estratégia alimentar do consumidor (Holling, 1959). As respostas de tipo I e II são comuns em invertebrados, enquanto a resposta de tipo III ocorre principalmente em vertebrados, mas não é restrita a estes (Hassell *et al.*, 2007). Neste estudo, o facto de os predadores serem de espécies diferentes, ainda que apresentem estratégias alimentares similares, influenciou o tipo de resposta funcional obtido.

Os predadores envolvidos nas experiências foram maioritariamente larvas da ordem Odonata. Em metade das áreas de estudo (Múrcia, Évora e Porto) foram considerados indivíduos da subordem Anisoptera ($n = 54$ por local), enquanto noutro local (Jaca) se consideraram indivíduos da subordem Zygoptera ($n = 28$). Nos restantes dois locais (Toledo e Peñalara), foram constituídos como predadores outras duas ordens de macroinvertebrados, Hemiptera e Coleoptera, contando também com 54 indivíduos

por local. Todos estes predadores consumiram diferentes espécies de presas zooplanctônicas, à exceção dos predadores do Porto e Peñalara. Na maioria dos locais foram utilizados indivíduos do gênero *Daphnia* como presas dos ensaios de predação.

Os predadores da ordem Odonata aparentam ser mais especialistas, dadas as características morfológicas que apresentam (p. ex. ao nível da máscara labial) e comportamentais (p. ex. ataque balístico, de acordo com Herrera *et al.*, 2018), reforçando a hipótese 3 (H3). As três espécies que pertencem à subordem Anisoptera, detêm estratégias alimentares similares (*sit-and-wait*). Neste tipo de estratégia, há pouca influência da temperatura e do tamanho corporal na taxa de captura das presas (Dell *et al.*, 2013; Novich *et al.*, 2014). A outra espécie de Odonata, pertencente à subordem Zygoptera, apresenta a mesma estratégia alimentar, contudo aparenta ser mais ativa e ter nicho ecológico diferente, o que levou a uma maior taxa de consumo. A velocidade tende a aumentar exponencialmente com a temperatura, possibilitando maior probabilidade de encontro e captura entre predadores com baixa mobilidade (velocidade do consumidor aprox. zero) com presas de alguma mobilidade (velocidade do recurso superior a zero) (Dell *et al.*, 2013).

Por outro lado, os predadores das ordens Hemiptera e Coleoptera aparentam ser menos especialistas em presas zooplanctônicas, explicado pela baixa taxa de consumo. Com predadores especialistas a taxa de consumo foi superior, ainda que possam ter existido alguns constrangimentos (p. ex. ocorrência de mudas) durante a experiência, que impediram um maior consumo. Tal não pode ser confundido com a eventual saturação (predador saciado). Deve também ser tida em conta alguma variabilidade entre os indivíduos do mesmo local, em termos de alguns estarem perturbados e/ou danificados ou não devido à sua manipulação (p. ex. no Porto foram detetados dois indivíduos danificados no final da experiência em cada um dos tratamentos, apesar de não parecer ter condicionado a mesma).

As larvas de Odonata são consideradas como predadores de topo, ocupando níveis tróficos superiores em muitos ecossistemas sem peixes (Mccauley *et al.*, 2015; May, 2019). As larvas e os adultos tendem a ser generalistas, alimentando-se de larvas e adultos de Diptera, respetivamente, embora frequentemente se alimentem das presas mais abundantes disponíveis (May, 2019). Segundo Novak *et al.* (2017), a maioria dos

predadores generalistas tem vindo a tornar-se cada vez mais especialista em experiências manipulativas com apenas uma presa específica. As espécies de Odonata são bioindicadoras eficientes da qualidade e integridade de habitats aquáticos e terrestres e, devido à sua sensibilidade, podem responder em múltiplas escalas temporais (Goffart, 2010; Miguel *et al.*, 2017). Este papel é extremamente importante em estudos que testem os efeitos das alterações climáticas (May, 2019). Tratam-se de organismos com ótimo térmico acima dos 20 °C, com limites térmicos elevados, particularmente a família Libellulidae (três espécies de Anisoptera abordadas) (Suhling *et al.*, 2015). Em termos de respiração, as larvas ou ninfas possuem respiração branquial (Díaz *et al.*, 2008).

Quanto aos predadores das ordens Hemiptera e Coleoptera abordados, estes são considerados mesopredadores em muitos sistemas, ocupando níveis tróficos intermédios (Meadows *et al.*, 2017). O género da ordem Hemiptera considerado detém uma estratégia *sit-and-wait* (Langer *et al.*, 2019), tal como a ordem descrita anteriormente. Quanto às larvas de Coleoptera, estas usam as mandíbulas para capturar e manipular as presas, alimentando-se principalmente de larvas de Culicidae e Chironomidae, embora sejam oportunistas e generalistas. Apesar disso, pode existir alguma especialização durante o desenvolvimento, determinada principalmente pelo tamanho das presas, passando também a consumir microcrustáceos (zooplâncton) (Wall *et al.*, 2006). Estes organismos são conhecidos por apresentarem estratégias alimentares de *sit-and-wait* (Bofill & Yee, 2019), mas para além desta podem ainda evidenciar captura ativa (Culler *et al.*, 2014). Nestas duas ordens, os indivíduos possuem capacidade natatória, deslocando-se ao longo da coluna de água e à superfície, tendo respiração aérea, efetuada através de espiráculos que retêm o oxigénio atmosférico (Díaz *et al.*, 2008). Embora estes predadores apresentem o mesmo tipo de estratégia alimentar que os da ordem Odonata, ocupam melhor a área disponível nas arenas, o que pode também influenciar as taxas de consumo. Em contrapartida, a maioria dos predadores Odonata ocupa apenas o fundo das arenas.

Apesar de todas as ordens consideradas terem praticamente a mesma estratégia alimentar, algumas detêm predadores com maior capacidade de movimento e com ocupação distinta na coluna de água, o que influencia a ocorrência das interações.

Enquanto as espécies *Notonecta* sp. e *Agabus* sp. ocupam uma zona mais superficial, com menor influência do aquecimento, tendem a alimentar-se de presas que se encontrem ao mesmo nível. O mesmo foi verificado com as espécies da ordem Odonata que ocupavam o fundo das arenas, onde as presas se encontravam principalmente concentradas, o que pode ter influenciado uma maior taxa de consumo. Também para estes predadores parece ter havido uma maior influência do aquecimento, dado que sob as arenas circulava a água quente.

Biomassa e tamanho corporal dos predadores

Quanto aos valores da biomassa, verificou-se que estes diferiram em locais com temperatura ambiente superior. De acordo com Weinbach *et al.* (2017), muitos estudos têm mostrado que a biomassa dos indivíduos tende a diminuir em locais com maior temperatura, desde que mantido o seu ótimo térmico. Contudo, tal não se verificou em Múrcia, sendo o local com a terceira maior biomassa de predadores registada. A espécie *S. fonscolombii* utilizada em Múrcia é caracterizada por indivíduos de tamanho corporal grande, com taxa de consumo considerável, não se verificando a hipótese de que locais com maior temperatura apresentam indivíduos com menor tamanho corporal. De acordo com Yvon-Durocher *et al.* (2015), o mesmo padrão foi observado para comunidades fitoplanctónicas. Apesar disso, se forem consideradas e comparadas apenas as três espécies com maior tamanho corporal e respetiva biomassa (predadores pertencentes à família Libellulidae no Porto, em Évora e em Múrcia por ordem decrescente), a hipótese é corroborada. Simultaneamente, a hipótese é reforçada em Toledo, visto que os predadores da espécie *Notonecta* sp. são caracteristicamente de menores dimensões e apresentavam a menor biomassa. É importante ressaltar que estes foram os predadores possíveis em cada um dos locais, embora não possa haver uma comparação direta por se tratarem de organismos de ordens diferentes. Este tipo de comparação deve ser feito entre indivíduos da mesma espécie.

Locais com a mesma temperatura ambiente nas experiências, como Évora e Porto, revelaram valores de biomassa consumida similares, diferindo apenas na biomassa dos predadores (Porto com predadores de biomassa superior e Évora com predadores de menor biomassa). Neste caso tratam-se de espécies diferentes, ainda que pertençam à mesma família. Alguns estudos (p. ex. Mccauley *et al.*, 2015) sugerem um aumento no

ritmo de desenvolvimento de organismos ectotérmicos, particularmente na ordem Odonata, em locais com maior temperatura. As taxas de desenvolvimento podem alterar a fenologia da metamorfose e a transição para o estado adulto (emergência). Por sua vez, outros estudos (p. ex. Gravel *et al.*, 2013) assumem que o tamanho corporal estrutura as interações tróficas, na medida em que predadores com maior tamanho corporal consomem maior número de presas, o que não se verificou neste estudo. Os predadores com maior biomassa (no Porto e em Évora) consumiram pouco (com valor > 0.1 mg.ind) relativamente a outros predadores de menor biomassa (em Jaca e em Múrcia) que consumiram bastante acima do valor intermédio (com valor > 0.5 mg.ind para o primeiro local e aproximado a 0.5 mg.ind para o segundo). O grau de grandeza da diferença do predador com maior biomassa média para o de menor (Porto e Toledo, respetivamente) foi de aproximadamente 7 mg.ind.

Gradiente térmico e temperaturas de cada tratamento por local

Locais com ambiente semelhante em termos de clima (Múrcia-Toledo, Évora-Porto, Jaca-Peñalara, segundo o gradiente térmico que reúne ambientes semiáridos até ambientes alpinos) não apresentaram o mesmo tipo de resposta funcional, uma vez que os predadores pertenciam a ordens diferentes, exceto os de Évora e Porto. Algumas das temperaturas de controlo (temperatura ambiente média), segundo os dados dos sensores de temperatura colocados no interior dos mesocosmos, são consistentes com o gradiente térmico dos locais. Apesar de as amostragens seguirem o início da primavera em cada um dos locais, apenas Múrcia (16.0 °C) foi consistente com este gradiente de temperatura, seguida de Évora-Porto (14.0 °C) e Jaca (12.6 °C). As temperaturas de Toledo e Peñalara (a menor temperatura, 12.5 °C, e a segunda temperatura mais alta, 14.5 °C, respetivamente) não foram consistentes com o gradiente térmico, o que pode ser explicado pela amplitude térmica diária abrangente nesta altura do ano nos dois locais. Toledo apresenta temperaturas amenas durante o dia, contudo nas últimas horas da noite nas primeiras da manhã fica bastante frio. Segundo os registos do mês anterior, a temperaturas máxima e mínima foram aproximadamente de 21 °C e de 5 °C, respetivamente. Todavia, Peñalara tem temperaturas frias durante grande parte da manhã, mas depois apresenta um período em que a temperatura pode subir bastante (zonas com menos vegetação, logo mais expostas) e ao final da tarde a temperatura fica

mais amena. Os registos deste último local mostram que a temperatura máxima foi de aproximadamente 24 °C e a mínima foi exatamente a mesma que em Toledo, durante o mês considerado. Isto, pode estar a influenciar a média mensal negativamente e positivamente em Toledo e Peñalara, respetivamente.

Por conseguinte, tal também se refletiu no tratamento de aquecimento, ao qual se acrescentou 5 °C à temperatura média mensal em cada local. É de salientar que o que mais influenciou a experiência nestes dois locais foi o facto de os predadores utilizados serem diferentes dos da ordem Odonata, apesar de as estratégias de captura serem similares. Estes na fase adulta permanecem com modo de vida aquático, não necessitando de responder rapidamente aos estímulos ambientais para se desenvolverem e emergirem. E ainda, é importante destacar que, estas temperaturas são apenas representativas do mês anterior ao período de amostragem, permitindo verificar diversas oscilações/flutuações que podem ser indício de eventuais alterações climáticas.

Ao longo deste século, o clima global tem sido alterado rapidamente, levando a um aumento da temperatura que tem causado impactos significativos sobre os seres vivos que coexistem na Terra (Goffart, 2010). O início de uma onda de calor (evento de aquecimento de curta duração), como indício de alterações climáticas, influencia a dinâmica das interações bióticas, em particular entre predadores e respetivas presas, com efeitos sobre a estabilidade, funcionamento e estrutura das comunidades. As interações predador-presa com organismos ectotérmicos são relevantes, na medida em que estes tendem a ser particularmente sensíveis a alterações ao nível do clima (Goffart, 2010). Um aumento da temperatura de 5 °C face à temperatura ambiente corresponde a uma projeção de um cenário para aproximadamente 100 anos (Mccauley *et al.*, 2015).

Este tipo de experiências pode ser abordado em instalações experimentais, como os mesocosmos, permitindo testar a complexidade de sistemas aquáticos, de forma controlada (Weinbach *et al.*, 2017). Os ecossistemas aquáticos naturais estão entre os mais ameaçados com perda de biodiversidade superior à dos ecossistemas terrestres (Miguel *et al.*, 2017). No geral, estas instalações fornecem ferramentas-chave à identificação dos processos ecológicos (p. ex. tamanho corporal) que impulsionam as respostas ao nível das espécies, populações e comunidades sob mudança climática

(Fordham, 2015). Particularmente, os mesocosmos são úteis para determinar de que modo a temperatura influencia a dinâmica populacional do par consumidor-recurso (Dell *et al.*, 2013), dado que se sabe que alguns estudos mostram uma forte influência (p. ex. Sentis *et al.*, 2012). Então, o aquecimento nestes sistemas pode provocar a alteração da estrutura das redes tróficas, influenciando negativamente a sua estabilidade, diversidade e persistência (Novich *et al.*, 2014). Quanto aos organismos ectotérmicos que colonizam locais com clima temperado, é esperado que estes resistam ou beneficiem com o aquecimento, por não atingirem o respetivo ótimo térmico (Fordham, 2015). Tal, foi verificado para os principais predadores deste estudo, as larvas da ordem Odonata, que providenciam uma melhor compreensão a longo prazo dos efeitos do aquecimento. Como bioindicadores que são, respondem a alterações impostas, que poderão afetar o seu desenvolvimento entre os meios aquático e terrestre (Mccauley *et al.*, 2015).

5. Limitações e direções futuras

Uma possível limitação deste estudo pode estar associada ao facto de os pares de interação serem diferentes entre locais, sobretudo ao nível dos predadores, o que dificulta a comparação das respostas funcionais com grupos de macroinvertebrados diferentes. Considerando que, a experiência foi realizada com os predadores que se encontravam abundantemente disponíveis, seria pertinente a realização de estudos com o mesmo par em cada um dos locais e em simultâneo com outros pares diferentes dos considerados e, caso não seja possível, pelo menos com predadores pertencentes à mesma ordem com estratégias alimentares idênticas. Simultaneamente, também se considera importante ter as mesmas espécies de predadores em locais com clima distinto, com o intuito de se averiguarem as diferenças no tamanho corporal. Uma possibilidade também seria aumentar o número de pares em cada um dos locais para ter uma maior representatividade de combinações de predadores e presas.

Por outro lado, o facto de os ensaios serem extrínsecos aos mesocosmos, isto é, não ocorrerem no seu interior, mas em laboratórios próximos das instalações. Isto, por si só, pode condicionar a experiência a diversos níveis (p. ex. baixa incidência de luz solar). Segundo Poley *et al.* (2018), as experiências de resposta funcional conduzidas em laboratório podem apresentar limitações na taxa de captura e tempo de manipulação das presas, o que pode ter condicionado a obtenção de determinados tipos de resposta.

Os próximos estudos que abordem as interações predador-presa deverão atentar numa abordagem implementada no interior dos mesocosmos, com vista a que os indivíduos possam estar sob todas as variáveis ambientais *in situ*, como por exemplo o fotoperíodo. Isto porque, uma maior incidência de luz solar favorece o metabolismo e a atividade dos organismos em estudo (Miguel *et al.*, 2017), o que é relevante em experiências com aquecimento.

No que diz respeito à duração das experiências nas áreas de estudo, esta foi relativamente curta para testar os efeitos do aquecimento e uma eventual onda de calor. Futuramente, seria importante perceber se ocorre perda de predadores a longo prazo associada ao aquecimento, aumentando a duração das experiências (ou seja, correr a experiência por mais tempo com eventuais reposições diárias de presas), com o objetivo de simular uma onda de calor e não apenas o seu início. Também a utilização de registos de temperatura terá evidenciado algumas inconsistências, pois apenas foram representativas do mês anterior à amostragem. Poderão ser considerados registos de temperatura mais abrangentes para obter um valor mais fidedigno, mas que, ainda assim, incluam apenas as temperaturas do início da estação considerada (p. ex. efetuar o mesmo procedimento, mas incluir também os valores da temperatura do ano anterior, no mesmo período).

Com os resultados obtidos também foi possível perceber que numa situação ideal deveria ter havido uma maior correspondência dos níveis de densidade entre os dois tratamentos para maximizar o ajuste das curvas. Neste estudo não foi possível, pois houve menor abundância de predadores do que o esperado, principalmente, tendo sido distribuídos pelas densidades intermédias e, subsequentemente, acrescentados níveis de densidade inferiores e superiores à temperatura ambiente. A natureza exploratória deste estudo (note-se que foi a primeira experiência do género ao longo de seis locais diferentes) condicionou a implementação de um desenho completamente ortogonal, privilegiando a consolidação das curvas a temperatura ambiente, primeiramente, e só depois o preenchimento dos replicados a temperatura induzida. A maioria dos tratamentos apresentou algum tipo de resposta e curva associada, garantidas pela abordagem adotada nos procedimentos estatísticos que permitiram estimar com alguma precisão os parâmetros mencionados (abordagem vantajosa face às

convencionais) (Rosenbaum & Rall, 2018). Contudo, esta abordagem é, no entanto, sensível ao volume de dados disponíveis, bem como da sua distribuição ao longo do gradiente de densidades. Por esse motivo, não foi possível nalguns casos estimar com exatidão os parâmetros funcionais ambicionados (isto é, a e Th que correspondem à taxa de captura e tempo de manipulação, respetivamente) nem obter relação estatística com as curvas já descritas para alguns dos tratamentos, havendo a necessidade de se adotar outras metodologias complementares no futuro.

Por sua vez, no início das experiências, as arenas experimentais deveriam ter sido dispostas de modo aleatório no interior dos tabuleiros de predação. Neste estudo, estas foram colocadas seguindo a ordem do desenho experimental, com o intuito de facilitar registos dos predadores e dos valores de oxigénio, bem como a obtenção de fotografias durante a experiência. Não havendo nenhuma indicação nos dados recolhidos de que isto possa ter influenciado os resultados, esta disposição poderia ter introduzido um fator de enviesamento se presas de maior tamanho fossem selecionadas e introduzidas nas primeiras arenas experimentais que foram preenchidas. Apesar de ter existido algum cuidado na recolha de indivíduos de tamanho aproximado, nalguns locais isto não foi possível por uma questão de abundância. Nos próximos estudos laboratoriais, deverá atentar-se um desenho experimental com colocação aleatória das arenas experimentais, com base na metodologia de estudos idênticos. O mesmo procedimento deverá ser realizado em estudos intrínsecos aos mesocosmos. Também se ressalva a importância da cooperação com outros autores que investiguem estas e outras questões referentes à temática.

Fatores como um número limitado de replicados e condições da experiência (p. ex. tamanho das arenas experimentais) também poderão ser otimizados. Em estudos futuros, poderão ser acrescentados replicados temporais ao longo da experiência, de forma a poder ajustar-se a curva de resposta funcional. Por exemplo, em lugar de todas densidades decorrerem em simultâneo, poderia haver um certo desfasamento. No início da experiência, poderiam ser colocadas algumas densidades iniciais ao longo do gradiente de densidades e, numa fase posterior, após a análise dos resultados da primeira fase, adicionavam-se somente replicados às zonas do gradiente identificadas como cruciais. Assim, evitava-se a sobreposição desnecessária de replicados. No caso de

se quiserem realizar contagens intermédias, sobretudo para as densidades elevadas, deverão ser amostrados alguns dos replicados durante a experiência para possibilitar este procedimento. A solução para este problema pode passar, ainda, pela otimização do sistema de fotografias e utilização de um modo automatizado para as contagens. Quanto a possíveis condições da experiência que podem ter provocado constrangimentos à resposta funcional de predadores com maior mobilidade, a solução passa por alterar o tamanho das arenas experimentais.

Por último, o foco deverá incidir sobre outros aspetos a melhorar referentes ao desenho experimental, de modo a que alguns dos objetivos iniciais possam ser realizados (p. ex. gravação de vídeos para o *software* Ethovision). Este procedimento foi realizado em alguns estudos com macroinvertebrados com capacidade natatória (p. ex. Ingram & Burns, 2018), o que seria fundamental para estudos seguintes que envolvam predadores com reduzida imobilidade. Em estudos futuros, ainda dirigido aos predadores, também deverá ser abordada a questão de diferenciação entre machos e fêmeas, se possível, dado que os primeiros podem ser mais sensíveis ao aquecimento em termos de tamanho corporal, como alguns estudos mostram (p. ex. Mccauley *et al.*, 2015). Para além disso, a análise de outros parâmetros como a respiração, relacionada à temperatura, seria extremamente relevante, dado que a respiração é vista como uma das características funcionais mais importantes em invertebrados (Díaz *et al.*, 2008).

6. Considerações finais

Os ensaios de predação mostraram respostas funcionais díspares entre tratamentos, excetuando em Évora, e entre locais com clima semelhante. No geral, a taxa de consumo de presas pelos predadores envolvidos foi superior no tratamento de temperatura ambiente. Contudo, a taxa de consumo nos ensaios de Múrcia e Jaca foi consideravelmente superior para o tratamento de aquecimento, o que revelou uma forte interação predador-presas associada ao aquecimento.

Com este estudo foi possível perceber que o desafio inerente à previsão das respostas dos ecossistemas naturais às alterações climáticas é bastante mais complicado do que aparenta. Como abordado, a solução é alcançada através da medição das interações num número considerável de experiências, de modo a testar os

potenciais efeitos do aquecimento num número representativo de predadores e presas em cada comunidade. Para tal, é importante a integração de modelação e de abordagens teóricas, utilizando dados de abundância e de características funcionais gerais. Isto, permite extrapolar as alterações nas interações, determinadas experimentalmente, a outras espécies da comunidade, com as quais seja mais difícil trabalhar. Em suma, as alterações climáticas e as respetivas consequências deverão ser alvo constante de preocupação científica e de gestão ambiental, tratando-se de uma prioridade atual e futura. Mediante esforços nacionais e internacionais, deverá existir esta perspetiva de previsão global que analise, não só o número de efetivos, o comportamento, a fisiologia e as interações entre as espécies, mas toda a rede ecológica e multifuncionalidade do ecossistema em estudo. Assim, os investigadores poderão fornecer orientações científicas que sustentem o desenvolvimento de estratégias e políticas na adaptação atempada às alterações ambientais de forma adequada e bem-sucedida (Araújo *et al.*, 2011). Tudo isto, contribuirá para aumentar a resiliência, plasticidade e adaptação da biodiversidade às referidas alterações, assegurando a sua persistência.

7. Referências

- Abram, P.K., Boivin, G., Moiroux, J. & Brodeur, J. (2017). Behavioural effects of temperature on ectothermic animals: unifying thermal physiology and behavioural plasticity. *Biological Reviews*, 92(4), 1859–1876.
- Antiqueira, P.A.P., Petchey, O.L. & Romero, G.Q. (2017). Warming and top predator loss drive ecosystem multifunctionality. *Ecology Letters*, 21(1), 72–82.
- Araújo, M.B., Alagador, D. Cabeza, M., Nogues-Bravo, D. & Thuiller, W. (2011). Climate change threatens European conservation areas. *Ecology Letters*, 14(5), 484–492.
- Archer, L.C., Sohlström, E.H., Gallo, B., Jochum, M., Woodward, G., Kordas, R.L., ... O’Gorman, E.J. (2019). Consistent temperature dependence of functional response parameters and their use in predicting population abundance. *Journal of Animal Ecology*, 88(11), 1670–1683.
- Askew, R.R. (2004). *The Dragonflies of Europe*. Harley Books. Colchester.
- Aspin, T.W.H., Matthews, T.J., Khamis, K., Milner, A.M., Wang, Z., Callaghan, M.J.O. & Ledger, M.E. (2018). Drought intensification drives turnover of structure and function in stream invertebrate communities. *Ecography*, 41(12), 1992–2004.
- Bache, S.M. & Wickham, H. (2014). magrittr: A Forward-Pipe Operator for R. R package (versão 1.5, <https://CRAN.R-project.org/package=magrittr>).
- Bálint, M., Domisch, S., Engelhardt, C.H.M., Haase, P., Lehrian, S., Sauer, J., ... Nowak, C. (2011). Cryptic biodiversity loss linked to global climate change. *Nature Climate Change*, 1, 313–318.
- Beauchamp, D., Wahl, D. & Johnson, B. (2006). Predator-Prey Interactions. *American Fisheries Society* (16), 765–842.
- Bellard, C., Bertelsmeier, C., Leadley, P., Thuiller, W. & Courchamp, F. (2012). Impacts of climate change on the future of biodiversity. *Ecology Letters*, 15, 365–377.
- Benke, A.C., Huryn, A.D., Smock, L.A. & Wallace, J.B. (1999). Length-Mass Relationships for Freshwater Macroinvertebrates in North America with Particular Reference to the Southeastern United States. *Journal of the North American Benthological Society*, 18(3), 308–343.
- Bofill, C.E. & Yee, D.A. (2019). An army of one: predaceous diving beetle life history stages affect interactions with shared mosquito prey. *Hydrobiologia*, 827(1), 201–209.
- Boggs, C.L. (2016). The fingerprints of global climate change on insect populations. *Elsevier*, 17, 69–73.

- Bolker, B. & R Development Core team (2017). Bbmle: Tools for General Maximum Likelihood Estimation. R package (versão 1.0.20, <https://CRAN.R-project.org/package=bbmle>).
- Cham, S. (2014). Field Guide to the Larvae and Exuviae of British Dragonflies: Dragonflies (Anisoptera) and Damselflies (Zygoptera), Volume 3. *British Dragonfly Society*.
- Chase, J.M. (2003). Strong and weak trophic cascades along a productivity gradient. *Oikos*, 101(1), 187-195.
- Colinet, H., Sinclair, B.J., Vernon, P. & Renault, D. (2015). Insects in Fluctuating Thermal Environments. *Annual Review of Entomology*, 60(1), 123–140.
- Collins, M., Knutti, R., Arblaster, J., Dufresne, J.L., Fichet, T., Friedlingstein, P., ... Wehner, M. (2013). Long-term Climate Change: Projections, Commitments and Irreversibility. *In: Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (Stocker, F. et al. (eds.))*. Cambridge University Press, (12), 1029-1136.
- Culler, L.E., Ohba, S. & Crumrine, P. (2014). Predator-Prey Interactions of Dytiscids. *In: Ecology, Systematics and the Natural History of Predaceous Diving Beetles (Coleoptera: Dytiscidae) (Yee, D. (ed.))*, Springer, (8), 363-386.
- Dell, A.I., Pawar, S. & Savage, V.M. (2013). Temperature dependence of trophic interactions are driven by asymmetry of species responses and foraging strategy. *Journal of Animal Ecology*, 83(1), 70–84.
- Denny, M. (2014). Buzz Holling and the functional response. *The Bulletin of the Ecological Society of America*, 95(3), 200–203.
- Díaz, A.M., Alonso, M.L.S. & Gutiérrez, M.R.V.A. (2008). Biological traits of stream macroinvertebrates from a semi-arid catchment: Patterns along complex environmental gradients. *Freshwater Biology*, 53(1), 1–21.
- Dijkstra, K.D. (2018). Field Guide to the Dragonflies of Britain and Europe. 1ª edição. *Bloomsbury Wildlife*.
- Dubois, N., Saulnier-Talbot, É., Mills, K., Gell, P., Battarbee, R., Bennion, H., ... Schillereff, D. (2017). First human impacts and responses of aquatic systems: A review of palaeolimnological records from around the world. *SAGE journals*, 5(1), 1–41.
- Dumont, H., Van de Velde, I. & Dumont, S. (1975). The Dry Weight Estimate of Biomass in a Selection of Cladocera, Copepoda and Rotifera from the Plankton, Periphyton and Benthos of Continental Waters. *Oecologia*, 19(1), 75-97.
- Durance, I. & Ormerod, S. (2007). Climate change effects on upland stream macroinvertebrates over a 25-year period. *Global Change Biology*, 13(5), 942–957.

- Englund, G., Öhlund, G., Hein, C.L. & Diehl, S. (2011). Temperature dependence of the functional response. *Ecology Letters*, 14(9), 914–921.
- Ewald, N., Hartley, S., & Stewart, A. (2013). Climate change and trophic interactions in model temporary pond systems: The effects of high temperature on predation rate depend on prey size and density. *Freshwater Biology*, 58(12), 2481–2493.
- Fordham, D.A. (2015). Mesocosms Reveal Ecological Surprises from Climate Change. *PLoS Biology*, 13(12), 1–7.
- García, F.C., Bestion, E., Warfield, R. & Yvon-Durocher, G. (2018). Changes in temperature alter the relationship between biodiversity and ecosystem functioning. *PNAS*, 115(43), 10989–10994.
- Gilman, S., Urban, M.C., Tewksbury, J., Gilchrist, G.W. & Holt, R.D. (2010). A framework for community interactions under climate change. *Trends in Ecology and Evolution*, 25(6), 325–331.
- Goffart, P. (2010). Southern dragonflies expanding in Wallonia (south Belgium): a consequence of global warming? *BioRisk*, 5, 109–126.
- Graham, M.D. & Vinebrooke, R.D. (2009). Extreme weather events alter planktonic communities in boreal lakes. *Limnology and Oceanography*, 54(6, parte 2), 2481–2492.
- Gravel, D., Poisot, T., Albouy, C., Velez, L. & Mouillot, D. (2013). Inferring food web structure from predator-prey body size relationships. *Methods in Ecology and Evolution*, 4(11), 1083–1090.
- Hassell, M.P., Lawton, J.H. & Beddington, J.R. (2007). Sigmoid Functional Responses by Invertebrate Predators and Parasitoids. *The Journal of Animal Ecology*, 46(1), 249–262.
- Heinrich, B. (1973). Mechanisms of Insect Thermoregulation. *In: Effects of Temperature on Ectothermic Organisms* (Wieser, W. (ed.)), Springer, Berlin, 139–150.
- Herrera, E.Q., Casas, J., Dangles, O. & Pincebourde, S. (2018). Temperature effects on ballistic prey capture by a dragonfly larva. *Ecology and Evolution*, 8(8), 4303–4311.
- Holling, C.S. (1966). The functional response of invertebrate predators to prey density. *Memoirs of the Entomological Society of Canada*, 98(S48), 5–86.
- Holling, C.S. (1965). The Functional Response of Predators to Prey Density and its Role in Mimicry and Population Regulation. *Memoirs of the Entomological Society of Canada*, 97(S45), 5–60.
- Holling, C.S. (1959). Some characteristics of simple types of predation and parasitism. *The Canadian Entomologist*, 91(7), 385–398.

- Hortal, J., de Bello, F., Diniz-filho, J.A.F., Lewinsohn, T.M., Lobo, J.M. & Ladle, R.J. (2015). Seven Shortfalls that Beset Large-Scale Knowledge of Biodiversity. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 46(1), 523–549.
- Ingram, T. & Burns, Z.D. (2018). Top down control by an aquatic invertebrate predator increases with temperature but does not depend on individual behavioral type. *International Journal of Business Innovation and Research*, 17(3), 8256–8265.
- Jackson, M.C., Wasserman, R.J., Grey, J., Ricciardi, A., Dick, J.T.A. & Alexander, M.E. (2017). Novel and Disrupted Trophic Links Following Invasion in Freshwater Ecosystems. *In: Advances in Ecological Research, Elsevier*, 57, 55-97.
- Johansson, F. (1993). Intraguild predation and cannibalism in odonate larvae: effects of foraging behaviour and zooplankton availability. *Oikos*, 66(1), 80–87.
- Juliano, S.A. (2001). Nonlinear curve fitting: Predation and functional response curves. *In: Design and analysis of ecological experiments (Scheiner, S.M. & Gurevitch, J. (eds.)) Oxford University Press*, 2ª edição, Oxford, 178-196.
- Kalinkat, G., Schneider, F.D., Digel, C., Guill, C., Rall, B.C. & Brose, U. (2013). Body masses, functional responses and predator-prey stability. *Ecology Letters*, 16(9), 1126–1134.
- Kassambara, A. (2019). Ggpubr: ‘ggplot2’ Based Publication Ready Plots. R package (versão 0.2.3, <https://CRAN.R-project.org/package=ggpubr>).
- Kolbert, E. (2019). A Sexta Extinção. 3ª edição, *ELSINORE*. Amadora.
- Kriska, G. (2013). Freshwater Invertebrates in Central Europe: A Field Guide. *Springer*. 1-412.
- Lampert, W. & Sommer, U. (2007). Interactions: Predator-Prey relationships. *In: Limnoecology: The Ecology of Lakes and Streams*, (6), 147-151.
- Langer, S.M., Weiss, L.C., Ekvall, M.T., Bianco, G., Hansson, L.A. & Tollrian, R. (2019). A three-dimensional perspective of Daphnia’s swimming behavior with and without predator cues. *Limnology and Oceanography*, 64(4), 1515–1525.
- May, M.L. (2019). Odonata: Who they are and what they have done for us lately: Classification and ecosystem services of Dragonflies. *Insects*, 10(62), 1-17.
- Mccauley, S.J., Hammond, J.I., Frances, D.N. & Mabry, K.E. (2015). Effects of experimental warming on survival, phenology, and morphology of an aquatic insect (Odonata). *Ecological Entomology*, 40(3), 211–220.
- Meadows, A.J., Owen, J.P. & Snyder, W.E. (2017). Keystone nonconsumptive effects within a diverse predator community. *Ecology and Evolution*, 7(23), 10315–10325.

- Miguel, T.B., Oliveira-Junior, J.M.B., Ligeiro, R. & Juen, L. (2017). Odonata (Insecta) as a tool for the biomonitoring of environmental quality. *Ecological Indicators*, 81, 555–566.
- Millán, A., Sánchez-Fernández, D., Abellán, P., Picazo, F., Carbonell, J.A., Lobo, J.M. & Ribera, I. (2014). Atlas de los coleópteros acuáticos de España peninsular. *Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente*. Madrid.
- Morales-Castilla, I., Matias, M.G., Gravel, D. & Araújo, M.B. (2015). Inferring biotic interactions from proxies. *Trends in Ecology and Evolution*, 30(6), 347–356.
- Nilsson, A. (2005). Aquatic Insects of North Europe: a taxonomic handbook - Odonata-Diptera, Volume 2. *Apollo Books*.
- Novak, M., Wolf, C., Coblenz, K.E. & Shepard, I.D. (2017). Quantifying predator dependence in the functional response of generalist predators. *Ecology Letters*, 20(6), 761–769.
- Novich, R.A., Erickson, E.K., Kalinoski, R.M. & DeLong, J.P. (2014). The temperature independence of interaction strength in a sit-and-wait predator. *Ecosphere*, 5(10), 1–9.
- Odum, E.P. (1984) The Mesocosm. *BioScience*, 34(9), 558-562.
- Paaijmans, K.P., Heinig, R.L., Seliga, R.A., Blanford, J.I., Blanford, S., Murdock, C.C. & Thomas, M.B. (2013). Temperature variation makes ectotherms more sensitive to climate change. *Global Change Biology*, 19(8), 2373–2380.
- Pellissier, L., Albouy, C., Bascompte, J., Farwig, N., Graham, C., Loreau, M., ... Gravel, D. (2018). Comparing species interaction networks along environmental gradients. *Biological Reviews*, 93(2), 785–800.
- Poley, K., Bahlai, C. & Grieshop, M. (2018). Functional Response of Generalist Predators to *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae) Eggs. *Environmental Entomology*. 47(5), 1117-1127.
- Pomeranz, J.P., Thompson, R.M., Poisot, T. & Harding, J.S. (2018). Inferring predator-prey interactions in food webs. *Methods in Ecology and Evolution*. 10(3), 356-367.
- Pritchard, D. (2017). Frair: Tools for Functional Response Analysis. R package (versão 0.5.100, <https://CRAN.R-project.org/package=frair>).
- Pritchard, D.W., Paterson, R.A., Bovy, H.C. & Barrios-O'Neill, D. (2017). FRAIR: an R package for fitting and comparing consumer functional responses. *Methods in Ecology and Evolution*. 8(11), 1528-1534.
- R Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing* (R - versão 3.5.3 e Rstudio - 1.1.453, <https://www.R-project.org/>).

- Rogers, D. (1972). Random search and insect population models. *The Journal of Animal Ecology*, 41, 369-383.
- Rosenbaum, B. & Rall, B.C. (2018). Fitting functional responses: Direct parameter estimation by simulating differential equations. *Methods in Ecology and Evolution*, 9(10), 2076-2090.
- Sabo, J.L., Bastow, J.L. & Power, M.E. (2002). Length–mass relationships for adult aquatic and terrestrial invertebrates in a California watershed. *Journal of the North American Benthological Society*, 21(2), 336–343.
- Sentis, A., Gémard, C., Jaugeon, B. & Boukal, D.S. (2017). Predator diversity and environmental change modify the strengths of trophic and nontrophic interactions. *Global Change Biology*, 23(7), 2629–2640.
- Sentis, A., Morisson, J. & Boukal, D.S. (2015). Thermal acclimation modulates the impacts of temperature and enrichment on trophic interaction strengths and population dynamics. *Global Change Biology*, 21(9), 3290–3298.
- Sentis, A., Hemptinne, J.L. & Brodeur, J. (2012). Using functional response modeling to investigate the effect of temperature on predator feeding rate and energetic efficiency. *Oecologia*, 169(4), 1117–1125.
- Singh, J.S. (2002) The biodiversity crisis: a multifaceted review. *Current Science*, 82(6), 638-647.
- Solomon, M.E. (1949). The natural control of animal populations. *Journal of Animal Ecology*, 18(1), 1-35.
- Stewart, R.I.A., Dossena, M., Bohan, D.A., Jeppesen, E., Kordas, R.L., Ledger, M.E., ... Woodward, G. (2013). Mesocosm Experiments as a Tool for Ecological Climate-Change Research. *Advances in Ecological Research*, 48, 71-181.
- Suhling, F., Suhling, I. & Richter, O. (2015). Temperature response of growth of larval dragonflies – an overview. *International Journal of Odonatology*, 18(1), 15–30.
- Tachet, H., Richoux, F., Bournaud, M. & Usseglio-Polatera, P. (2010). Invertébrés d'eau douce – systématique, biologie, écologie. CNRS Editions.
- Towers, D.J., Henderson, I.M. & Veltman, C.J. (1994). Predicting dry weight of New Zealand aquatic macroinvertebrates from linear dimensions. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 28(2), 159–166.
- Veselý, L., Boukal, D.S., Buřič, M., Kozák, P., Kouba, A. & Sentis, A. (2017). Effects of prey density, temperature and predator diversity on nonconsumptive predator-driven mortality in a freshwater food web. *Scientific Reports*, 7(1), 1–9.
- Wall, W.P., Barman, E.H. & Beals, C.M. (2006). A description and functional interpretation of the mandibular geometry of *Agabus punctatus* (Melsheimer, 1844), *Rhantus*

calidus (Fabricius, 1792) and *Acilius mediatu*s (Say, 1823), (Coleoptera: Dytiscidae). *Aquatic Insects*, 28(4), 277–289.

Weinbach, A., Allhoff, K., Thebault, E., Massol, F. & Loeuille, N. (2017). Selective effects of temperature on body mass depend on trophic interactions and network position. *bioRxiv*, 1-48.

Weterings, R., Umponstira, C. & Buckley, H.L. (2015). Predation rates of mixed instar Odonata naiads feeding on *Aedes aegypti* and *Armigeres moultoni* (Diptera: Culicidae) larvae. *Elsevier*, 18(1), 1–8.

Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York.

Wickham, H. (2011). The Split-Apply-Combine Strategy for Data Analysis. *Journal of Statistical Software*, 40(1), 1-29 (<http://www.jstatsoft.org/v40/i01/>).

Williamson, C.E., Neale, P.J., Hylander, S., Rose, K.C., Figueroa, F.L., Robinson, S.A., ... Worrest, R.C. (2019). The interactive effects of stratospheric ozone depletion, UV radiation, and climate change on aquatic ecosystems. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 18(3), 717-746.

Xie, Y. (2019). knitr: A General-Purpose package for Dynamic Report Generation in R. R package (versão 1.25).

Yvon-Durocher, G., Allen, A.P., Cellamare, M., Dossena, M., Gaston, K.J., Leita

o, M., ... Trimmer, M. (2015). Five Years of Experimental Warming Increases the Biodiversity and Productivity of Phytoplankton. *PLoS Biology*, 13(12), 1–22.

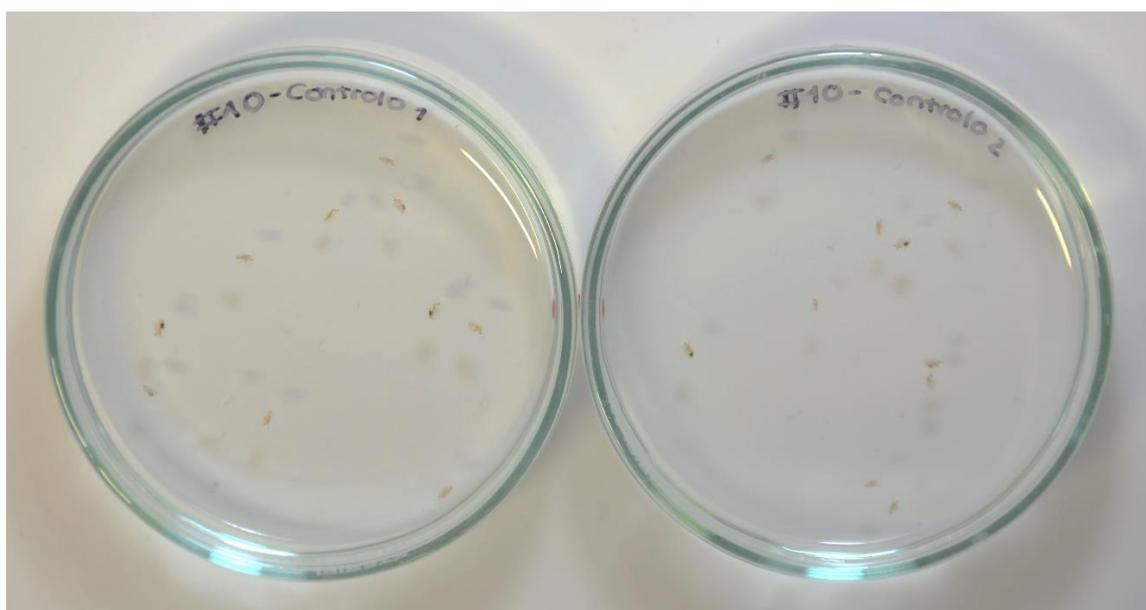
Yvon-Durocher, G., Montoya, J.M., Trimmer, M. & Woodward, G. (2011). Warming alters the size spectrum and shifts the distribution of biomass in freshwater ecosystems. *Global Change Biology*, 17(4), 1681–1694.

8. Anexos

8.1. Anexo I



Anexo I Figura 1 - Replicado com 40 presas (*Daphnia pulicaria*) e respectivo predador (*Crocothemis erythraea*) de uma das experiências do estudo-piloto

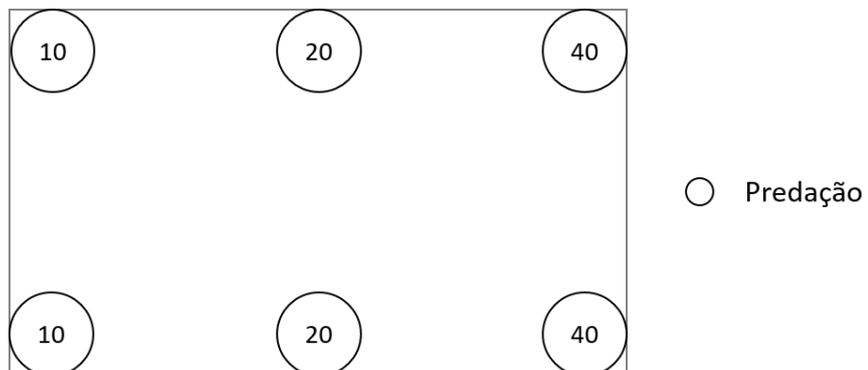


Anexo I Figura 2 - Controlos com 10 presas cada de uma das experiências do estudo-piloto



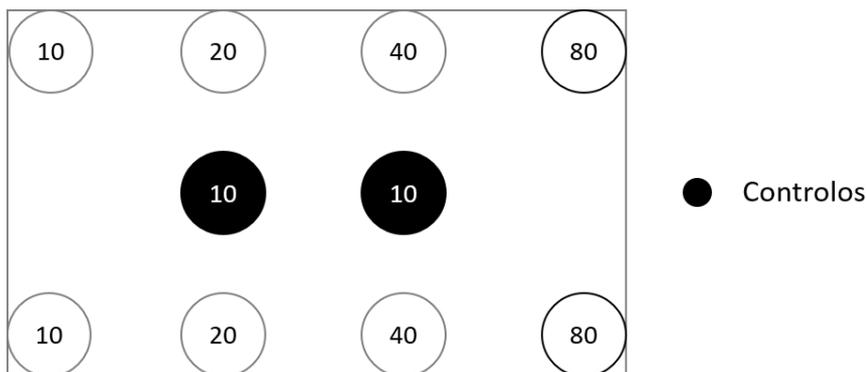
Anexo I Figura 3 - Suporte e câmara digital utilizados para a obtenção de fotografias das experiências do estudo-piloto

1º ensaio do estudo-piloto: 24 h (contagem de presas vivas às 1, 2, 21 e 24 horas após o início do ensaio, permitindo inferir presas consumidas)



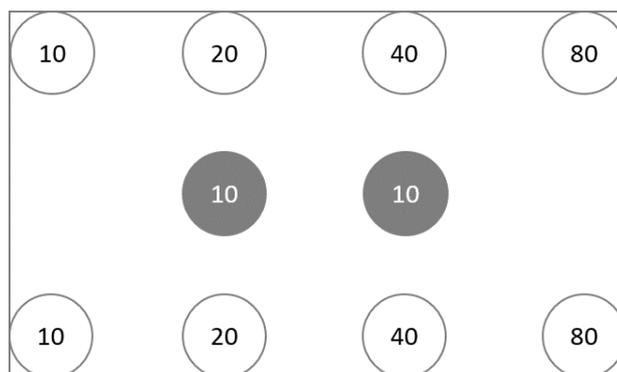
Anexo I Figura 4 - Desenho experimental do 1º ensaio do estudo-piloto com as densidades de 10, 20 e 40 presas (dois replicados para cada)

2º ensaio do estudo-piloto: 24 h (contagem às 0.5, 1, 2, 4, 6, 21 e 24 horas)



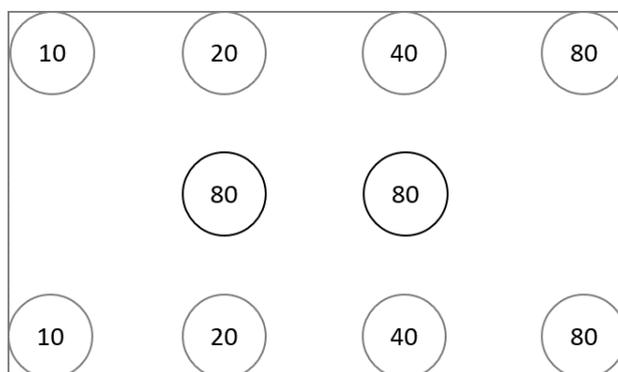
Anexo I Figura 5 - Desenho experimental do 2º ensaio do estudo-piloto com controlos de 10 presas (preenchimento a preto) e com as mesmas densidades que o estudo anterior (círculo cinzento) e uma densidade adicional de 80 presas (círculo preto)

3º ensaio do estudo-piloto: 24 h (contagem às 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 e 24 horas)



Anexo I Figura 6 - Desenho experimental do 3º ensaio do estudo-piloto igual ao da experiência anterior, variando apenas nas horas de contagem das presas

4º ensaio do estudo-piloto: 6 h (contagem às 1, 2, 4, e 6 horas após o início da experiência)



Anexo I Figura 7 - Desenho experimental do 4º ensaio do estudo-piloto com dois replicados adicionais para a densidade de 80 presas (círculo a preto), sem controlos e com a mesma duração das experiências de predação em campo

Anexo I Tabela 1 - Análise estatística do último ensaio do estudo-piloto. Valor de p : '****' $p < 0.001$

Pacote	Função	Correlação	t	Pr(> t)	Sig.
<i>stats</i>	<i>lm</i>	0.9009	9.101	1.71E-05	***

8.2. Anexo II

A monitorização e a amostragem *in situ* consistem na execução de diversos procedimentos-padrão nos 192 mesocosmos dos locais considerados, a cada primavera. Estes procedimentos permitem estudar as variáveis abióticas e bióticas de cada mesocosmo no primeiro período de campo (4/5 dias por local seguindo o gradiente térmico). Neste período decorreram ainda algumas experiências, entre as quais a de predação, enquanto outras foram prolongadas até ao segundo período (2/3 dias). Alguns dos procedimentos efetuados foram a amostragem de ADN ambiental (*Environmental DNA* - eDNA), a verificação de níveis de metano e nutrientes, a análise de macrófitos, as amostragens de fitoplâncton e zooplâncton e as medições de variáveis ambientais e físico-químicas (condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$), temperatura da água ($^{\circ}\text{C}$) e oxigénio dissolvido (mg/L), com recurso a um leitor multiparamétrico HQ40D (Hach)).

Ao nível de macroinvertebrados, foram realizados dois tipos de amostragem para o seu armazenamento (grande parte no estado larvar). Uma amostragem quantitativa, em que se procedeu à colocação de um *core* de 50 L no mesocosmo, representando 5 % do volume deste. Posteriormente, foram feitos dez arrastos com uma rede de aquário (500 μm) em toda a sua área, percorrendo a coluna de água e a superfície do substrato. Subsequentemente, num tabuleiro com água do mesocosmo foi colocado todo o material proveniente dos arrastos, o qual foi passado por um crivo de malha fina (250 μm) e, finalmente, com auxílio de uma colher, um funil e um esguicho com etanol (96 %), a amostra foi armazenada e conservada no respetivo frasco devidamente etiquetado. Por sua vez, a amostragem qualitativa passa por um processo idêntico, embora se percorra a área total do mesocosmo. O que se obteve por arrasto foi colocado num tabuleiro, no qual foram recolhidos exemplares de macroinvertebrados que não estivessem presentes na amostra quantitativa ou organismos que se pretendesse incluir para posterior confirmação de espécies em laboratório. Estes exemplares foram também colocados em frascos com etanol etiquetados. Entre mesocosmos, os materiais usados

(rede de aquário, tabuleiro, colher, pinça, entre outros) foram desinfetados com lixívia e água para evitar transferências de material biológico, procedimento que foi efetuado em todos os passos da monitorização.

Na fase de amostragem qualitativa procedeu-se a uma recolha de determinados organismos selecionados, incluindo zooplâncton (com vista abranger alguns grupos funcionais), bem como de macrófitos, algas ou perifíton (fontes de alimento) para análise de isótopos, sendo realizada apenas em oito mesocosmos escolhidos para o efeito (quatro aquecidos e quatro não aquecidos). Mais uma vez, o processo de recolha foi semelhante, contudo os exemplares foram separados por espécie em diferentes frascos, tendo sido, numa fase posterior, colocados em *ependorfs* e transferidos para azoto líquido para futuras análises. Procedimentos como a secagem e a pesagem das amostras decorrem em laboratório (a quantidade necessária para organismos é 1 mg e para os recursos é 2 mg). Estas análises de isótopos podem beneficiar experiências de predação ao permitirem remontar a cadeia trófica da comunidade, fazendo compreender qual a dieta de cada uma das espécies que cada mesocosmo alberga. Isto, possibilita perceber todas as interações entre os indivíduos envolvidos.

8.3. Anexo III

Anexo III Tabela 1 - Análises estatísticas segundo o pacote *frair*. Valor de p : '****' $p < 0.001$

Tratamento	Local	z	Pr(> z)	Evidência Tipo II	Sig.
Controlo	Murcia	-15.945	< 2.2E-16	Sim	***
	Toledo	-9.226	< 2.2E-16		***
	Évora	-9.473	< 2.2E-16		***
	Porto	-13.029	< 2.2e-16		***
	Jaca	-12.939	< 2.2E-16		***
	Penãlara			Não	
Aquecimento	Murcia	-3.438	0.0005863	Sim	***
	Toledo			Não	
	Évora	-11.149	< 2.2E-16	Sim	***
	Porto			Não	
	Jaca	-4.506	6.62E-06	Sim	***
	Penãlara	-6.063	1.33E-09		***